



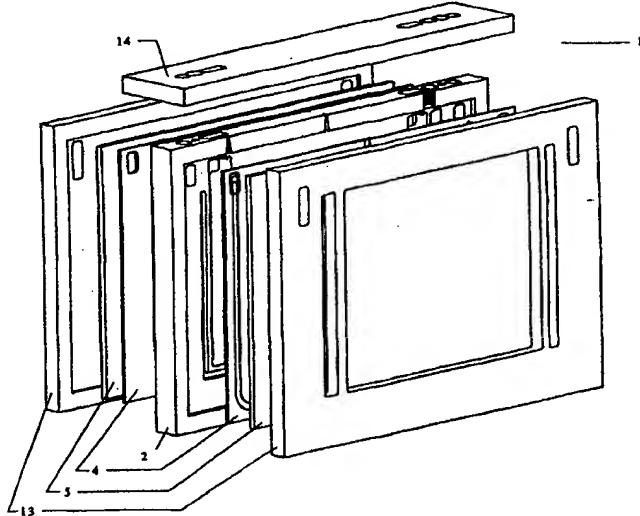
(51) Internationale Patentklassifikation 7 : <b>G01N 27/447, C07K 1/26, B01D 57/02</b>		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/02039</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Januar 2000 (13.01.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/04411		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Juni 1999 (25.06.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 31 210.5 3. Juli 1998 (03.07.98) DE			
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): WITA GMBH [DE/DE]; Wittmann Institutes of Technology and Analysis of Biomolecules, Warthestrasse 21, D-14513 Teltow (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): WITTMANN-LIEBOLD, Brigitte [DE/DE]; Meisenstrasse 17, D-14195 Berlin (DE). WURZEL, Christian [DE/DE]; Undinestrasse 4, D-12203 Berlin (DE). SCHELER, Christian [DE/DE]; Teltower Damm 227B, D-14167 Berlin (DE). REUTER, Andreas [DE/DE]; Stargarder Strasse 75, D-10437 Berlin (DE).			
(74) Anwälte: HENGELHAUPT, Jürgen, D. usw.; Lützowplatz 11-13, D-10785 Berlin (DE).			

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SEPARATING BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR TRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN

## (57) Abstract

The present invention relates to a method and to devices for the electrophoresis separation of gel biomolecules into one and two dimensions in an electrophoresis apparatus. This invention can essentially be used for separating proteins, glycoproteins, lipoproteins, nucleic acids or cellular complexes, etc. A first device according to this invention is characterised in that a combined electrophoresis chamber (1) comprises a central portion (2) with cooling members (3). These members are arranged under electrophoresis chambers (6, 7) which are formed on either side of the central portion (2) by a plurality of inner (4) and outer (5) plates interacting with isolation members (9) which can be removed or switched. The cooling members are also arranged under buffer vessels (8, 21). A second combined chamber is also provided for the electrophoresis separation of biomolecules or other mixtures of substances in the form of horizontally superposed gels into one or two dimensions, wherein said chamber comprises a base-wall plate as well as a cover plate. This invention further relates to a method for carrying out the separation into one and into two dimensions, as well as to the formulation of specific gels.



(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren und Vorrichtungen zur ein- und zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoresearratur und dient insbesondere der Auftrennung von beispielsweise Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen. Eine erste erfundungsgemäße Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß eine Elektrophoresekombikammer (1) einen Kern (2) mit Kühllementen (3) aufweist, wobei die Kühllemente (3) unter den beidseitig des Kerns (2) durch innere Platten (4) und äußere Platten (5) im Zusammenwirken mit entfernbarer oder schaltbaren Isolierelementen (9) gebildeten Gelkammern (6, 7) und Puffergefäßen (8 und 21) angeordnet sind. Eine zweite Kombinationskammer zur ein- oder zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in waagerecht übereinander angeordneten Gelen durch Elektrophorese weist eine Rückwandplatte und eine Deckplatte auf, wobei zwischen Rückwandplatte und Deckplatte mindestens zwei Umlenkelemente zur Führung von Isolierelementen angeordnet sind. Es wird weiterhin das Verfahren zur ein-dimensionalen sowie zwei-dimensionalen Trennung und die Rezeptur spezifischer Gele beschrieben.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

5

---

## Verfahren und Vorrichtung zur Trennung von Biomolekülen

---

10

### Beschreibung

15

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur ein- oder zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen in Gelen durch Elektrophorese in einer Elektrophoresearratur und dient insbesondere der Auftrennung von beispielsweise Proteinen, Glycoproteinen, Lipoproteinen, Nukleinsäuren oder Zellkomplexen in Gelen (z. B. in Polyacrylamidgelen, Harnstoffgelen oder Agarosegelen) in zwei Dimensionen.

20

Proteine und Peptide sind Biopolymere, die zu Tausenden in jeder Zelle vorkommen; sie sind die unmittelbaren Genprodukte, die alle Zellprozesse katalysieren, stimulieren und regulieren. Ihre Struktur und Funktionsanalyse bildet die Basis für die Aufklärung aller wichtigen Zellvorgänge und ist die Grundlage zum Verständnis von Krankheitsprozessen auf der molekularen Ebene und in der molekularen Medizin, z.B. bei der Tumorentstehung und zur Entwicklung von Frühdiagnostika und neuen Therapeutika in der Pharmaindustrie. Wegen der oft sehr geringen Konzentrationen, in denen die Peptide und Proteine in der Zelle vorkommen, ist es notwendig, hochempfindliche Nachweismethoden und Trenntechniken für ihre Charakterisierung zu entwickeln.

Proteine sind aus langen Ketten von Aminosäuren aufgebaut und weisen eine für jedes Protein spezifische räumliche Struktur auf. Jedes Protein hat eine individuelle Aminosäurefolge, die Primärsequenz, die sich zu einer jeweils spezifischen Raumstruktur (3D-Struktur) 5 auffaltet, die Träger der physiologischen Funktion im Zellgeschehen ist. Proteine nehmen als direkte Genprodukte eine zentrale Stellung bei allen Lebensprozessen ein. Sie katalysieren die 10 biosynthetischen Vorgänge als Enzyme, bauen den Organismus als Strukturproteine auf, bewerkstelligen Stofftransport und Signaltransduktion und spielen eine wesentliche Rolle bei der Translation der Erbinformation (Proteinbiosynthese) und bei allen 15 Regulationsvorgängen. Eine einzelne Zelle enthält über 5000 unterschiedliche Proteine. Biosynthese und Expression jedes Proteins sind genauestens reguliert. In unterschiedlichen Geweben kommen verschiedene Expressionsmuster zustande. Außerdem können posttranskriptionale Veränderungen in den Proteinen auftreten, wie z.B. 20 Phosphorylierungen beim Hitzeschockprotein 27, die von physiologischer Bedeutung sind und in der zwei-dimensionalen Elektrophorese ein charakteristisches Muster nach immunchemischer Anfärbung im Western-Blot ergeben. Daher ist es wichtig, die Expression nicht nur auf der 25 Gen- und Botennukleinsäure (mRNA)-Ebene zu studieren, sondern auch die Proteine, ihre Zusammensetzung und Konzentration in den unterschiedlichen Zellen und Geweben, besonders beim Menschen, genauestens zu kennen. Nach der Totalsequenzierung ganzer Genome, wie z.B. dem 30 aus Hefe oder wie im Humangenomprojekt konzipiert, kommt daher der Erforschung der Proteine und ihren Zellfunktionen eine zentrale Bedeutung zu. Wenn in einigen Jahren das menschliche Genom mit ca. 100.000 Genen 35 bekannt sein wird, werden sich die Wissenschaftler mehr und mehr der Erforschung der durch die Gene ko-

dierten Proteine zuwenden müssen, was unter dem Begriff Proteomforschung zusammengefaßt wird. Nur ein Bruchteil dieser wichtigen Biomoleküle ist bisher auf der molekularen Ebene bekannt. Ohne die Strukturinformationen können jedoch die Vorgänge des Zellstoffwechsels und seiner regulatorischen Zusammenhänge nicht verstanden werden. Dies ist besonders bei der Aufklärung der Entstehung von Krankheiten unumgänglich. Viele der über 5000 Zellproteine sind weder in ihrer Struktur noch in ihrer Funktion bekannt. Um ihre biologische Bedeutung und physiologische Rolle zu verstehen, werden in modernen Forschungsprojekten Totalzellextrakte oder die Gesamtproteine aus Einzelzelllinien in hochauflösenden zwei-dimensionalen Gelelektrophoresen (2DE) getrennt und sichtbar gemacht. Zellextrakte aus verschiedenen Gewebeproben, z.B. aus Tumorgewebe, können so miteinander und mit gesunden Gewebeproben verglichen und die Proteine durch proteinchemische und massenspektrometrische Analysen identifiziert und charakterisiert werden. Auf diese Weise lassen sich krankheits-assoziierte Proteine nachweisen, die als Marker zur Früherkennung der Krankheiten dienen oder den jeweiligen Grad der Krankheit, z.B. bei der Tumorentstehung, präzise charakterisieren können.

Da die Proteine oft nur in kleinsten Mengen exprimiert werden, ist es wichtig, hochsensitive Verfahren zur Trennung und Identifikation zu entwickeln. Um die ehrgeizigen, in die Zukunft weisenden Forschungsprojekte in Zusammenhang mit der Genomfunktionsanalyse bewerkstelligen zu können, sind neue, innovative Trenn- und Analyse-Techniken vonnöten.

Ein- und zwei-dimensional durchgeföhrte Gelelektrophoresen von Proteinen, Nukleinsäuren, oder anderen Biomolekülen sind seit langem in der Biochemie, der pharma-

zentischen Industrie, Medizinforschung und Laborpraxis eingeführte Techniken, um schnelle Auftrennungen, Vergleiche von Trennmustern oder Qualitätskontrollen von Isolaten und Produkten durchzuführen. Die Elektrophoresekammern und ihr Zubehör (Powersupply, Kühlsysteme, Detektoren) sind längst zu unumgänglichem Inventar in jedem naturwissenschaftlichen, pharmazeutisch oder labormedizinisch ausgerichteten Laboratorium geworden.

Für die Trennung von Biomolekülen in einer Trennrichtung (ein-dimensionale Elektrophorese, 1DE) stehen zahlreiche Elektrophoresekammersysteme und Trennmethoden zur Verfügung, die je nach anstehendem Trennproblem auf die speziellen Anwendungen adaptiert sind. Die Trennung einzelner Proben erfolgt zumeist in Kapillarröhrchen oder Gelstreifen und die Trennung multipler Proben wird zumeist in Flachgelen (Slabgelen) durchgeführt, bei denen Auftragstaschen am oberen Ende einer dünnen auspolymerisierten Gelschicht ausgespart sind. Diese Geltaschen werden beim Gießen durch Einbringung von sogn. Kämmen während der Polymerisation vorbereitet. In diese Taschen werden nach Polymerisation des Geles und Entfernung der Kämme die Proben eingebracht. Für Trennungen komplexer Protein- und Peptidmischungen in langen Gelen (>10 cm) stehen weit weniger Kammersysteme zur Verfügung.

Die Auftrennung in zwei verschiedenen Dimensionen (2DE), bei denen unterschiedliche Bedingungen für die Auftrennung in den beiden Dimensionen gewählt werden (z.B. erste Dimension: Trennung nach Ladung, zweite Dimension: Trennung nach Molekülgröße) stehen keine einfach handbaren Komplettsysteme zur Verfügung, die sich zur Vollautomatisierung eignen. Gewöhnlich muß bei diesen Elektrophoresen jede Dimension in einer anderen Kammer durchgeführt und das nach der ersten Dimension

gewonnene Trenngel auf das vorbereitete Gel der zweiten Dimension manuell aufgebracht und dort einpolymerisiert werden. Erst dann kann die elektrophoretische Trennung der Probe in der zweiten Dimension erfolgen. Die manuell durchgeföhrten Teilschritte sind zeitaufwendig, erfordern viel Geschicklichkeit und erlauben eine Perfektion und Reproduzierbarkeit nur bis zu einem gewissen Grad, in Abhängigkeit von der Person, die die Handhabung durchführt.

10 IDE Trennnungen von Proteinen und Peptiden werden zumeist in kleinen Kammern in 5-11 cm langen polymerisierten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Quervernetzung und unterschiedlicher Dicke (z.B. 0.7 bis 1.5 mm) und Breite durchgeföhr (in sogn. Slabgele). Hierzu werden auf das in flüssiger Form zwischen zwei Glasplatten gegossene Gel nach Polymerisierung die Proben aufgetragen und in einer Elektrophoreseapparatur für mehrere Stunden bei 500 bis 2000 Volt/20 cm aufgetrennt. Danach wird das Gel entnommen und zur Anfärbung der Substanzen in eine Färbelösung getaucht; danach zur Entfernung des Überschusses an Farbstoff in einer Entfärbelösung entfärbt und dabei werden die Substanzen sichtbar. Sie können durch Photographie oder durch Einscannen im Computer in ihrer Lage auf dem Gel dokumentiert werden, z.B. für Vergleiche mit anderen Proben. Es können zwischen dünnen Glasplatten auch sogn. trägerfreie Elektrophoresen durchgeföhr werden, bei denen die zu trennenden Substanzen in einem dünnen Pufferfilm ohne jedweden Träger elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für andere Biomoleküle, wie Nukleinsäuren oder hochmolekulare Komplexe werden z.B. auch Agarosegele zur Trennung verwandt.

Alternativ zu den Slabgelen hat sich die Trennung in der ersten Dimension auch in feinen Glaskapillaren (i.D. 0.7 bis 1.5 mm) bewährt, in die die zunächst flüssige Gelmischung zur Polymerisation eingebracht wird und die Substanzmischung danach von oben eingespritzt wird. Die Kapillaren werden zunächst in einem Gelgießständer mit Gel versetzt, dann dort polymerisiert und erst nachdem sie in die Elektrophoresekammer verbracht worden sind, mit der Probensubstanz befüllt.

Nach der Durchführung der unter Hochspannung aufgetrennten Proben müssen die Gele, die sehr weich und flexibel sind, vorsichtig aus den Kapillaren zur Einbringung in die Färbe-/Entfärbelösung ausgestoßen werden, wobei mechanische Defekte an den Gelen entstehen können. Wegen der schwierigen Handhabung werden zunehmend auch schmale Flachgele (2 x 5-10 cm dünne Streifengele), die als getrocknete Fertiggele kommerziell zur Verfügung stehen, für die 1DE verwandt (z.B. von der Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg).

Zur Trennung in der zwei-dimensionalen Technik (2DE) müssen die Gele aus der ersten Dimension (die Gele aus den Kapillaren oder die Gelstreifen) für die Auftrennung in der zweiten Dimension durch manuelle Manipulation auf ein entsprechend vorbereitetes Flachgel (Slabgel), das bereits vorpolymerisiert ist, aufgebettet und auf dieses Flachgel aufpolymerisiert werden. Erst danach kann die Trennung in der zweiten Dimension in der entsprechenden Elektrophoresekammer für die 2. Dimension durchgeführt werden. Nach der Trennung erfolgt die übliche Färbungs- und Entfärbungstechnik und Dokumentation der Ergebnisse. Verschiedene Gele und Puffersysteme für die Durchführung von gelelektrophoretischen Proteintrennungen in zwei Dimensionen sind be-

schrieben worden: In der zuerst beschriebenen Version werden z.B. Gemische von ribosomalen Proteinen in Harnstoffgelen getrennt, bei denen die pH-Bedingungen in den beiden Dimensionen variiert werden. Verfahren zur Auftrennung von hoch komplexen Proteinmischungen, z.B. aus intakten Zellen, Zelllinien oder Geweben nutzen in der ersten Dimension Trennungen auf Grund verschiedener Ladung der Proteine durch Isoelektrofokussierung (IEF) und in der zweiten Dimension Trennungen nach Molekülgröße in SDS-Natrium-dodecylsulfat-Gelen. Für die Durchführung der Isoelektrofokussierung werden entweder Immobilone oder Ampholine benutzt, die in das Gel eingebracht werden. Mit der letzteren Technik gelingt es mehr als 10000 Proteine eines Zelllysates aufzutrennen; die erstere Technik mit Immobilonen ist für Trennungen von etwa 2000 Proteinen konzipiert. Bei Verwendung von Ampholingradienten sind Trennungen von mehr als 10000 Proteinen beschrieben worden (Klose und Kobalz, 1995). Diese hochauflösenden Proteingelelektrophorese-Techniken werden für die moderne Proteomforschung, die Ermittlung der exprimierten Proteine einer Zelle und ihrer krankhaften Veränderungen, z.B. bei der Untersuchung der Tumorentstehung, genutzt. Die Krankheits-assoziierten Proteine können nach Auftrennung in der hochauflösenden zwei-dimensionalen Gelelektrophorese mittels proteinchemischer und massenspektrometrischer Verfahren identifiziert werden.

Die US 4,666,581 beschreibt eine Vorrichtung zur zweidimensionalen Elektrophorese, bei welcher jedoch beide Gele nur in räumliche Nähe gebracht werden. Statt manueller Handhabung, die schwierig und fehlerbehaftet ist, wird hier eine Mechanik, ein komplizierter Drehmechanismus, zum Übertragen des Geles von der ersten Dimension zur zweiten Dimension eingesetzt. Die Puffergefäße sind nicht integriert. Der Stromfluß muß

auf komplizierte Art und Weise über Filterstreifen sichergestellt werden.

Mit der US 4,874,490 wird ebenfalls ein System zur  
5 zwei-dimensionalen Elektrophorese beschrieben, wobei das Patent kein vollständig integriertes System offenbart und ein Gießgestell benötigt. Auch sind die Puffergefäß für die kathodischen und anodischen Pufferlösungen nicht integrale Bestandteile der Kammer.  
10 Weiterhin ist in diesem System keine Kühlung integriert. Es erfolgt die Trennung der ersten Dimension horizontal und in der zweiten Dimension vertikal. Die Gele müssen in der beschriebenen Konstruktion zwingend nacheinander in mehreren Schritten gegossen werden.  
15 Es muß zuerst die zweite Dimension in einem konventionellen Gießständer außerhalb der Elektrophoresekammer gegossen werden. Nach dem Gießen müssen über das Gel der zweiten Dimension Dicht-/Isolierstreifen durch mechanische Manipulation eingefügt werden. Danach erst kann das Gel für die erste Dimension gegossen werden.  
20 Anschließend wird der Spacer wieder entfernt. Die Probenaufgabe in größeren Mengen ist ungelöst. Beschrieben ist nur das Tränken einer Membran. Die Aufgabemenge und deren Aufkonzentrierung ist beschränkt.  
25

Weiterhin beschreibt die DE 4244082 A1 sowie die US 5,407,546 ein Verfahren und eine Vorrichtung zur hochauflösenden zwei-dimensionalen Elektrophorese.  
Wesentlich hierbei ist die selektive Rehydratisierung.  
30 Es wird ausdrücklich ein zusammenhängendes Gel ("Ein-Molekül") verwendet. Als Ausgangsmaterial können nur getrocknete Gele verwendet werden und diese müssen rehydratisiert und reäquilibriert werden. Das geschieht vor und nach der ersten Dimension und gesondert wird das Gel der zweiten Dimension rehydratisiert. Es ist kein vollautomatischer Ablauf möglich, da das Gel der

ersten Dimension in ein geheiztes Äquilibriatorgefäß transferiert und umgepuffert werden muß. Damit liegt keine vollständige Integration vor.

5 Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Verfahren und Vorrichtungen zu schaffen, mit welchen mit einfachen Mitteln in einer einzigen Apparatur mit selbstgegossenen Gelen und/oder getrockneten Fertig-  
10 gelen effektive Gelelektrophoresen der ersten und zweiten Dimension manuell oder vollautomatisch durchgeführt werden können. Es ist weiterhin Aufgabe der Erfindung, spezifische Fertiggele anzugeben.

15 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Merkmale in den Ansprüchen 1, 9, 16, 19, 23 und 24.  
Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen enthalten.

20 Ein besonderer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß eine Vollautomatisierung der gesamten 2DE einfach durchgeführt werden kann, indem die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension nacheinander oder  
25 gleichzeitig vertikal zueinander angeordnet, als Gießgele oder Fertiggele in eine Elektrophorese-Kombikammer eingebracht und im Falle der gegossenen Gele voneinander isoliert polymerisiert werden, nachfolgend Pufferlösungen eingefüllt, z.B. ein Proteinextrakt auf die Gele der ersten Dimension aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung der ersten Dimension bei konstanter Temperatur oder bei fixiertem Temperaturgradienten mit z.B. ansteigender elektrischer Spannung durchgeführt, anschließend die Pufferlösung abgesaugt, die Isolierung aufgehoben, in  
30 die entstehenden Räume zwischen erster und zweiter  
35

Dimension Kontaktgel eingefüllt und auspolymerisiert, Pufferlösungen eingefüllt und die elektrophoretische Trennung der zweiten Dimension bei präzise eingestellter Temperatur und konstanter elektrischer Leistung oder steigender Stromstärke durchgeführt wird und abschließend die Gele z.B. mit Färbelösung entwickelt und die Proteine mit herkömmlichen Methoden auf den Gelen sichtbar gemacht werden.

Ein weiterer Vorteil der Erfindung besteht darin, daß die zwei-dimensionale Trennung in der erfindungsgemäßen Elektrophorese-Kombikammer nur mit einer einzigen Vorrichtung bewerkstelligt wird, die für die Durchführung beider Elektrophorese-Dimensionen eingerichtet ist und die Elektrophorese-Kombikammer einen Kern mit Kühlelementen aufweist, wobei die Kühlelemente beidseitig des Kerns durch aus inneren Platten und äußeren Platten im Zusammenwirken mit entfernbarer oder schaltbaren Isolierelementen gebildeten Gelkammern und Puffergefäß angeordnet sind.

In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung ist es möglich, daß die Elektrophorese in einer Kombinationskammer durchgeführt wird, jedoch muß kein Kühlelement im Kern integriert sein. Es kann eine externe Kühlung über den Puffer im unteren Puffergefäß der zweiten Dimension erfolgen. Eine spätere Integration der Kühlung in die rückwärtige Platte der Kammer ist jedoch ebenso möglich.

Ein zusätzlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, daß das Gießen der Gele vor dem Auftrag der Substanzen im neuen Kammersystem in demselben Raum erfolgt, in dem auch die Trennungen selber in den beiden Dimensionen der Elektrophorese durchgeführt werden. Es entfallen

daher zwei separate Gießständer (jeweils einer für die erste und für die zweite Dimension). Die Gele für die beiden Elektrophorese-Dimensionen werden vor Beginn der Substanztrennung in der Elektrophorese-Kombikammer vorbereitet und stehen beim Start der jeweiligen Elektrophoresen bereit. Alle Manipulationen zum Gießen der Gele werden in einem Arbeitsgang vor Beginn des Probenauftrags gemacht.

Ebenfalls vorteilhaft ist eine optimale Kühlung, die sowohl in der Elektrophoresekammer (für beide Dimensionen) als auch in den Pufferkammern für beide Dimensionen sichergestellt wird.

In bisherigen Techniken werden die Gele und die Pufferlösungen der ersten Dimension zumeist gar nicht gekühlt und die bisher realisierten Kühlungen für die 2. Dimension weisen Mängel auf (Temperaturdifferenzen innerhalb der Gele; ungenügende Kühlung der Puffer).

Variable Programmierungen des Elektrophoreseablaufes (Stufenprogramme, Gradientenprogramme, Temperaturprogramme etc.) lassen sich ausführen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es möglich, daß die Kühlung der Gele und Puffergefäße über den gekühlten Puffer im unteren Puffergefäß der zweiten Dimension oder durch integrierte Kühlvorrichtungen in der rückwärtigen Platte der Kammer erfolgt. Für die erste Dimension wird auf Puffergefäß verzichtet. Das Gel ist in direktem Kontakt mit den Elektroden am rechten und linken Gelende.

Die Elektrophorese-Kombikammer lässt sich auch für ein-dimensionale Trenngele variabler Länge (z.B. 10 bis 30 cm) für die Auftrennung multipler Proben verwenden. Die Trennungen können in der Kombikammer reproduzierbar

unter genau festgelegten Standardbedingungen durchgeführt werden.

Ebenso ist es auch möglich, die Elektrophorese-Kombikammern für die Auftrennung mehrerer Proben, z.B. 20 Proben, in einem ein-dimensionalen SDS-Gel zu benutzen, wobei die Proben mit Hilfe eines Auftragskammes auf dem Gel der 2. Dimension aufgebracht werden. Ein entsprechender Einsatz mit Probentaschen wird eingebracht, wo sonst das Gel für die 1. Dimension enthalten ist.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es möglich, daß auch nur eine ein-dimensionale Trennung von oben nach unten mit einer großen Anzahl an Proben erfolgt, indem anstelle des Gels der ersten Dimension und des Isolierelementes ein Probenkamm bei der Herstellung der 2. Dimension eingesetzt wird, um Taschen für den Probenauftrag zu erhalten. Nach Herstellung des Gels wird der Kamm entfernt. In die einzelnen Kammpositionen können dann verschiedene Proben eingebracht und ein-dimensional getrennt werden.

Die erfindungsgemäße Elektrophoresekombikammer enthält vorzugsweise zwei mal zwei Gele, deren Zahl sich beliebig erweitern lässt. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es möglich, daß pro Einheit die Kammer vorzugsweise nur die beiden Gele für die erste und die zweite Dimension enthält. Es lassen sich jedoch beliebig viele Kammern parallel elektrophoretisch entwickeln.

Die Gelpaare für die Trennung in der ersten Dimension werden parallel elektrophoretisch entwickelt und sind zunächst von den Gelen für die Durchführung der zweiten Dimension durch eine nicht-leitende Isolierung getrennt, die danach beispielsweise mechanisch von außen ohne Aufschrauben der Kammer entfernt und durch

ein leitendes Medium ersetzt wird, das die Kontakte zu den Gelen für die Durchführung der zweiten Dimension herbeiführt. Die Gele für die erste und zweite Dimension werden jeweils paarweise nacheinander unter 5 verschiedenen Bedingungen entwickelt, ohne daß das Gel von der ersten Dimension auf die zweite mechanisch transferiert werden muß. Die Elektrophorese-Kombikammer hat für beide Dimensionen eine integrierte Kühlvorrichtung und integrierte Füll- und Puffergefäß. 10 Der Deckelaufsatz der Elektrophorese-Kombikammer enthält die elektrischen Sicherheitsverbindungen für die Verbindung mit dem Powersupply, die Verbindungen zum Kühlaggregat und alle notwendigen Einfüllstutzen für das Gießen der Gele, für das Eingießen der 15 Elektrolysepuffer und die Einführung der Probe.

Die erfindungsgemäße 1DE/2DE-Elektrophorese-Kombikammer dient z.B. der Trennung von komplexen Proteinmischungen für die Auf trennung von Proteinen aus Geweben, Zelllinien oder Mikroorganismen, die mehr als 5000 Proteine 20 enthalten können. In der Elektrophorese-Kombikammer können sowohl analytische als auch präparative Elektrophoresen durchgeführt werden, wobei je nach Stoffklasse z.B. isoelektrische Fokussierung und SDS-Elektrophorese 25 oder Trennungen in Agarose, Harnstoff oder anderen Trennmedien Verwendung finden können. Die Kammer ist thermostatisierbar, enthält alle Puffergefäß für die Durchführung der ersten und zweiten Dimension und einen Aufsatz, der es erlaubt die Elektrophoresen unter hohen 30 Spannungen z.B. bis 5000 Volt durchzuführen. Die Elektrophorese-Kombikammer dient z.B. der Identifizierung von krankheitsassoziierten Proteinen, zur Entwicklung von Markerproteinen bei der Erstellung von Frühdiagnosen von Krankheiten und zur Entwicklung neuartiger 35 Pharmaka. Zellprozesse wie Embryonalentwicklung, Transport- und Signaltransduktionsprozesse und Regulations-

und Expressionsmuster können mit Hilfe der Elektrophorese-Kombikammer studiert werden. Sie eignet sich zur Auflösung von >5000 Proteinen und ist damit ein vorzügliches Instrument für die Untersuchung in der Proteomforschung, einem neuen Forschungs- und Entwicklungsgebiet in der medizinischen und pharmazeutischen Grundlagenforschung und für industrielle Anwendungen, z.B. bei der Untersuchung ganzer Zellinhalte und ihrer Veränderungen oder zur Untersuchung des Einflusses von Pharmaka auf die Zellprozesse.

Ein besonderer Vorteil einer zweiten Ausführungsform der Erfindung besteht darin, daß eine Vollautomatisierung der gesamten 2DE einfach durchgeführt werden kann, indem die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension waagerecht zueinander, also übereinander angeordnet werden.

Diese waagerechte Anordnung wird dadurch ermöglicht, daß die Isolierelemente zwischen den Gelen der ersten Dimension und den Gelen der zweiten Dimension ebenfalls in einem definierten Bereich waagerecht verlaufen, gleichwohl jedoch über Umlenkelemente zur Führung nach oben hin aus der Kombinationskammer herausgezogen werden können.

Ein weiterer Vorteil der zweiten Ausführungsform der Erfindung besteht darin, daß mit der gleichen Kombinationskammer auch die ein-dimensionale Trennung durchgeführt werden kann, indem anstelle des Gels für die Trennung in der ersten Dimension sowie des Isolierelementes ein Kamm mit Probentaschen für verschiedene Proben in das SDS-Gel eingesetzt und dieses auspolymerisiert wird, der Kamm nach dem Auspolymerisieren entfernt, die Proben in die

entstandenen Aussparungen eingebracht und nachfolgend die ein-dimensionale Elektrophorese durchgeführt wird.

Hierzu wird auf den Einsatz des Isolierelementes verzichtet und statt dessen ein Kamm mit Probentaschen beim Auspolymerisieren des SDS-Geles mit eingesetzt, der nach Auspolymerisierung des Geles herausgenommen wird, so daß nunmehr multiple Ports für das Auftragen verschiedener Proben im Gel enthalten sind. Diese können alle parallel zueinander in der ein-dimensionalen Elektrophorese getrennt werden. Die Konstruktion der Kombinationskammer bleibt also erhalten und es können sowohl ein-dimensionale wie zwei-dimensionale Gele im gleichen Kammersystem durchgeführt werden. Vorteilhaft ist auch, daß lange Laufstrecken, z.B. 32 cm lange ein-dimensionale Gele, durchgeführt werden können.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in den Figuren dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 eine Explosivdarstellung der wesentlichen Konstruktionsteile der Elektrophorese-Kombikammer,

Fig. 2 den Aufbau des inneren Kernes,

Fig. 3 den inneren Kern mit angeordneter innerer Platte,

Fig. 4 die Elektrophorese-Kombikammer mit eingelegten Dichtungen und angeordneten Isolierungen,

Fig. 5 die Elektrophorese-Kombikammer, einseitig komplett montiert mit Druckrahmen.

Fig. 6 bis 10 eine Prinzipdarstellung der Kombinationskammer in einer Konstruktionsvariante in den einzelnen Komplettierungsstufen

Die Elektrophorese-Kombikammer 1 zur Trennung von beispielsweise komplexen Proteinmischungen ermöglicht die elektrophoretische Trennung nacheinander in zwei verschiedenen Dimensionen, d.h. unter verschiedenen Bedingungen.

Wie in Fig. 1 zu ersehen ist, besteht die Elektrophorese-Kombikammer 1 aus mehreren Teilen, die miteinander durch Verschraubung zusammengesetzt werden: den inneren Kern 2 zur effektiven Kühlung, beidseitig damit verbunden die inneren Platten 4 und die äußeren Platten 5, zwischen denen sich beiseitig je ein freier Raum für ein Flachgel (1. und 2. Dimension) befindet. Mit Hilfe einer Dichtung 19 werden diese Platten 4,5 gegeneinander gedichtet und gleichzeitig die Dicke des Geles festgelegt (z.B. 0.75 mm oder 1.5 mm). Während die innere Platte 4 aus einem gut die Temperatur leitenden Material gefertigt ist (z.B. einer speziellen gut leitenden Keramik, dünner Kunststoff), ist die äußere Platte 5 vorzugsweise aus einem transparenten Material (z.B. Glas), um maximale Durchsicht zu gewähren. Die äußeren Platten 5 werden durch beidseitiges Anschrauben je eines Druckrahmens 13 gehalten; Klammern werden nicht, wie sonst üblich, verwandt. Die untere Begrenzung der Elektrophorese-Kombikammer 1 ist durch einen justier- und drehbaren Tisch gegeben, auf dem die Elektrophorese-Kombikammer 1 mittenfixiert ist. Auf der Elektrophorese-Kombikammer 1 befindet sich ein Aufsatz in Form eines Deckels 14, in den Zulauf 11 und Ablauf 12 für das thermostatisierte Kühlwasser und Einleitungen für die Puffergefäß 8 und 21 der ersten und zweiten Dimension (jeweils für den Anoden- und Kathodenpuffer), für Einfüllstutzen und die Zuführungen der Elektroden eingearbeitet sind. Die Einleitungen für die Puffergefäß 8 und 21 dienen zunächst als Einfüllstutzen für das Eingießen der Gelflüssigkeiten. Der innere

Kern 2 und die Druckrahmen 13 sind z.B. aus Polymermaterial (z.B. Acrylglas, Plexiglas) gefertigt und im Druckrahmen 13 sind Fenster in der Größe der Gele ausgespart, damit die Gießvorgänge der Gele und die Durchführung der Elektrophoresen leicht von außen beobachtet werden können.

Der innere Kern 2 (Fig. 2) und die zwei inneren Platten 4 werden vom Hersteller verklebt (Fig. 3). Weiterhin sind Puffergefäße 8 und 21, die teilweise gleichzeitig Füllkammern für die Gele sind, angeordnet. Die inneren Platten 4 schließen das Kühllabyrinth 10 (Kühlmaander) dicht ab, haben aber Öffnungen zu den Puffergefäßen 8 der ersten Dimension (Puffer, 1. Dim.) und Puffergefäß 21 der zweiten Dimension (Puffer 2. Dim.), wie in Fig. 2 und 3 dargestellt. Die Kühllemente 3, 10 sind unter den Gelen lokalisiert und kühlen nicht nur die Gele der ersten (Gel 1) und zweiten Dimension (Gel 2), sondern auch die Puffergefäße (Puffer 1. Dim und Puffer 2. Dim.).

In der Figur 3 (Kern komplett verklebt; muß nach den Elektrophoresen nicht demontiert werden) ist rechts oben die Füllkammer 8 für das 1. Dim. Gel mit Füllröhre 17a für Gel 1 und gleichzeitig die Pufferkammer 8 für die erste Dimension (Lauf 1. Dimension) wiedergegeben.

Außerdem sind links oben die Füllkammer 17b mit Füllrohr für das 2. Dim. Gel und gleichzeitig die Puffergefäße 21 für die 2. Dimension (Lauf 2.Dim.) dargestellt. Die linke Füllkammer 17b endet unten mittig, um ein gleichmäßiges Eingießen der Gelflüssigkeit von unten nach oben zu ermöglichen, wobei eine Entlüftungsöffnung 18 mit einer schräg ausgebildeten oberen Begrenzung für ein gleichmäßiges, langsames und Luftblasen-freies Eingießen sorgt.

In einer speziellen Ausführungsform ist die Elektrophorese-Kombikammer 1 oberflächenbeschichtet. Es handelt sich dabei um eine Oberflächenbeschichtung der die Medien Gel, Gellösungen und Pufferlösungen berührenden Teile mit amorphen Kohlenstoffschichten. Vorteile der Beschichtung sind, daß durch niedrige Oberflächenenergie ein Anhaften von Medienbestandteilen verhindert (analog zu Teflon) und somit die Entnahme des Gels nach der Trennung sowie die Reinigung des Gerätes erleichtert wird, die Schicht eine Hartstoffsicht ist und somit eine hohe Kratzfestigkeit aufweist und thermisch stabil ist. Alternativ können diese Oberflächen auch silanisiert werden.

Zur Durchführung der Elektrophorese werden folgende Arbeitsschritte absolviert:

1. Im ersten Arbeitsschritt wird auf den kompletten Kernaufbau eine zweiteilige Dichtung 19 aufgelegt (Fig. 4).
2. Dann werden im zweiten Arbeitsschritt Isolierschläuche 9 (z.B. 0.75-1.5 mm Rundschläuche oder viereckiges Material, z.B. Silikon), in vorgegebene Vertiefungen eingezogen (Fig. 4). Diese dienen der seitlichen Abgrenzung des 1. Gels von dem 2. Gel und der seitlichen Begrenzung des 2. Gels nach außen.
3. Als dritter Arbeitsschritt wird die äußere Glasplatte 5 aufgelegt.
4. Im vierten Schritt wird der Druckrahmen 13 aufgelegt und mit den Schrauben festgespannt (Fig. 5).
5. Im fünften Schritt wird der bisher entstandene Körper umgedreht und Schritt 1-4 für die Vorbereitung der Parallelgelle analog wiederholt.
6. Im sechsten Schritt werden die zwei Gele in die zwischen den Isolierschläuchen 9 gebildete Gelkammern 6 für die erste Dimension gegossen, danach so-

gleich die zwei Gele in die Gelkammern 7 für die zweite Dimension.

7. Der Deckel 14 wird aufgesetzt und die Polymerisierung wird z.B. über Nacht vorgenommen.
- 5 8. Danach werden die Pufferlösungen eingefüllt und dann kann der Proteinextrakt nach hochtourigem Zentrifugieren auf die 1. Dim. Gele aufgetragen werden.
- 10 9. Dann erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in der ersten Dimension.
10. Danach wird der 1. Dimension-Elektrophoresepuffer abgesaugt und die beiden Isolierschläuche 9, die die 1. Gele von den 2. Gelen trennen, von außen herausgezogen, was sehr leicht vonstatten geht, und die entstehenden freien Kapillaren zwischen den Gelen durch Einfüllen von Stackinggelflüssigkeit befüllt, so daß nach Polymerisierung dieser Flüssigkeiten der Kontakt zwischen dem jeweils ersten und zweiten Gel gegeben ist.
- 20 11. Dann wird die Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt.
12. Nach Durchführung der Elektrophorese in der zweiten Dimension werden die Verschraubungen gelöst, die Gele zusammen mit den äußeren Glasplatten 5 abgelöst und in ein Färbe- und Entfärbebad gegeben. Danach sind die Gele für die Dokumentation bereit.
- 25 13. Die Durchführung neuer Gele ist nach Säuberung der Gelplatten und der Füll- und Puffergefäß sofort wieder möglich.

30

Durch Montage mehrerer Einheiten können bis zu 10 2DE-Gele in einem Arbeitsgang durchgeführt werden.

35

Beim Gießen der Gele der ersten Dimension werden die Gele als Flachgele in dem durch Füllrohr 17a und Gelkammer 6 gebildeten U-Rohr gegossen und polymerisiert

dort aus. Dazu wird zuerst ein Stopgel mit hoher Quervernetzung gegossen, das den unteren Bereich des U-Rohrs ausfüllen soll. Die nach Zugabe eines Polymerisationsstarters noch flüssige Gellösung wird hierfür in das äußere Pufferreservoir der ersten Dimension gegeben, wobei das Gel nur den unteren Bereich des U-Rohres ausfüllt. Es reicht etwa 10 mm über das untere Ende der beiden als Isolierschläuche ausgebildeten Isolierelemente hinaus.

Nach dem Auspolymerisieren wird das Separationsgel für die erste Dimension gegossen. In diesem Gel wird die Proteintrennung z.B. durch Isoelektrofokussierung durchgeführt. Zum Gießen wird die noch flüssige Separationsgellösung in das zweite (weiter innen gelegene) Pufferreservoir der ersten Dimension über die Füllkammern 8 eingegossen, bis der Bereich der ersten Dimension zwischen den beiden Isolierelementen 9 vollständig gefüllt ist. Das Gießen der Gele erfolgt unter konstanter Temperatur, (z.B. bei 20 °C, wozu die Kühlung angeschaltet ist) bis das Gel auspolymerisiert ist.

Das Gel der zweiten Dimension wird zwischen den beiden Isolierelementen 9 von unten in die Apparatur eingegossen, indem die Gellösung über das Gießreservoir der zweiten Dimension eingefüllt wird. Die Gellösung fließt von dort über das Füllrohr 17b nach unten und tritt in der Mitte der Gelkammer 7 aus. Die Luft wird durch den Gießvorgang automatisch nach oben verdrängt und kann über die Entlüftungsöffnung entweichen, bis die Gellösung den Bereich der zweiten Dimension vollständig gefüllt hat.

Das Gel polymerisiert bei konstanter Temperatur (z.B. durch Kühlung auf 20°C) aus.

Im folgenden wird die Durchführung der ersten Dimension beschrieben.

Die beiden Pufferreservoir (8) der ersten Dimension werden einmal mit einer alkalischen und einer sauren Pufferlösung gefüllt (z.B. 0,1N NaOH; 7% v/v H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Die eine Pufferlösung fließt dabei in das U-Rohr bis zum Stopgel hinein, während die andere das Separationsgel überschichtet. Das Separationsgel wird dann mit einer Schutzlösung höherer Dichte als der Puffer überschichtet (z.B. 6% (w/v) Glycerin, 4 M Harnstoff, 1,5% (w/v) Ampholyte in H<sub>2</sub>O). Die Proben können durch Unterschichten unter die Schutzlösung auf das Separationsgel der 1. Dimension über Einfüllöffnung 20 aufgetragen werden. Die elektrophoretische Trennung erfolgt dann z.B. unter konstanter Temperatur (z.B. Kühlung auf 18 °C) mit einem Spannungsgradienten von anfänglich z.B. 100V bis z.B. 3000V über mehrerer Stunden. Nach dem Ende der Trennung werden die Pufferlösungen abgesaugt.

Bei der Durchführung einer 2DE muß die Probe immer auf das Gel der ersten Dimension aufgetragen werden; die aufgetrennten Banden nach der ersten Dimension werden dann in der zweiten Dimension weiter aufgetrennt.

Vor Beginn der elektrophoretischen Trennung in der zweiten Dimension werden die drei Isolierelemente 9 durch Herausziehen nach außen entfernt. Der Hohlraum zwischen den Gelen der ersten und zweiten Dimension wird mit einem Kontaktgel (z.B. Agarose) gefüllt, das schnell auspolymerisiert. Dann werden die beiden Puffergefäß 21 der zweiten Dimension mit Laufpuffer (z.B. SDS-Laupuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 5 µM Bromphenolblau in H<sub>2</sub>O) gefüllt. Die Trennung erfolgt unter Temperierung auf z.B. 15 °C, z.B. bei konstanter Leistung oder mit einer Stromstärke von z.B. 40 mA pro Gel in den ersten 20 Minuten und dann mit 75 mA pro Gel. Die Trennung ist mit Erreichen des Markerfarbstoffes Bromphenolblau am Ende des Geles beendet. Die Elek-

trophorese-Kombikammer wird auseinandergeschraubt und das Gel zur Entwicklung und Färbung entfernt.

Das Elektrophoresegel wird nun nach Stand der Technik weiterbehandelt und z.B. in eine Wanne mit Fixierlösung gegeben. Durch Silberfärbung können die Proteine in ng-Mengen für analytische Zwecke sichtbar gemacht werden oder mittels z.B. Coomassie Brilliant Blue für mikropräparative Zwecke (z.B. anschließender enzymatischer Spaltung und Sequenzierung) behandelt werden. Alternativ kann das Gel nach Blotten für Immunofärbungen mit entsprechenden Antikörpern entwickelt werden. Diese Schritte sind nicht Bestandteil der Erfindung, aber unerlässlich, um die Proteine nach erfolgter Trennung sichtbar zu machen.

Die Gele werden im vorliegenden Ausführungsbeispiel als Flachgele (nicht mehr als Rundgele), aber schmäler als in den bisherigen Flachgel-Systemen ausgeführt. Die Breite des Geles kann durch Wahl verschieden breiter Dichtstreifen, Schläuche etc.) variabel gehalten werden, so daß sowohl analytische als auch mikropräparative Gele gemacht werden können. In den üblichen käuflichen Flachgel-Elektrophorese-Kombikammern werden Fertiggele bestimmter Breiten und Dicken verwandt. Außerdem werden bei dem vorliegenden Verfahren Ampholine (lösliche Zwittermoleküle) anstelle von immobilisierten Zwitterionen (Immobilone) benutzt, um den pH-Gradienten im Gel aufzubauen. Prinzipiell ließen sich in der erfindungsgemäßen Vorrichtung aber auch Immobilone verwenden; jedoch sind die Trenneigenschaften dieser Gele bisher weniger gut als die mit Ampholinen erzeugten. Vorteile der beschriebenen Elektrophorese-Kombikammern sind:

- Variable Breiten der Gele;
- längere Trennstrecken, ohne daß die Gele beschädigt werden können;
- Einsatz variabler Proteinmengen in der gleichen Apparatur;
- kein Transfer des Geles von der ersten auf die zweite Dimension nötig;
- keine Rehydratisierung wie bei Fertiggelen notwendig;
- bei Verwendung von Fertiggelen keine Anwendung erhöhter Temperatur wie dies bei Rehydratisierungsschritten angewandt wird;
- sowohl Fertiggelstreifen als auch selbst-gegossene Gele können verwendet werden.
- präzise Fixierung des Geles relativ zur 2. Dimension;
- Pufferreservoir mit im Kammersystem eingebunden;
- Kühlung beider Gele routinemäßig durchführbar;
- die Kühlung ermöglicht identische Temperaturprofile für beide Parallelgele durch meanderförmige Zwangsführung des Kühlmediums; keine unterschiedlichen Strömungsverhältnisse;
- Kühlung aller Puffergefäß (für die 1. und 2. Dim);
- Einführung des sog. Stoppgels (dient zur mechanischen nicht aber elektrischen Abtrennung des Geles der ersten Dimension zu einem dazugehörigen Puffergefäß);
- gleichzeitiges Gießen beider Dimensionen möglich; daher Zeitersparnis, da die Gele vor Gebrauch erst polymerisieren müssen; d.h. beide Gele können gleichzeitig auspolymerisieren (z.B. über Nacht) und sind dann frühmorgens gebrauchsfertig;
- die Trennung erfolgt horizontal, nicht vertikal, ohne daß Kippvorgänge notwendig sind. Die Stellung der Kammer ändert sich nicht während des Gelgießens und bei der Elektrophorese. Die Apparatur steht nach der Montage aufrecht, d.h. platzsparend.

Nach Durchführung der ersten Dimension ist neu, daß die Isolierschläuche 9 oder Isolierstreifen 9 ohne Öffnen der Kammer nach der ersten Dimension entfernt werden. Volle Automatisierung ist möglich bei Einsatz eines Schrittmotors zum Entfernen der Isolierelemente 9.

Neu ist ebenfalls die Einführung einer leitenden Kontaktflüssigkeit (z.B. auf Agarose-Basis) in den entstehenden Hohlraum zwischen dem Gel der 1. und der 2 Dim., damit der elektrische Übergang zur 2. Dimension gewährleistet ist ohne daß eine Umpufferung notwendig wird. Die Umpufferung kann aber durchaus stattfinden, indem der entstehende Zwischenraum nach Entfernen der Isolierschläuche 9 mit Pufferlösung gespült wird.

In der zweiten Dimension ist neu, daß das Füllen der Gellösung für die zweite Dimension von unten bei aufrechter Stellung der Elektrophorese-Kombikammer erfolgt. Die Lösung wird automatisch langsam eingefüllt (wegen des Durchmessers der Füllkammer), so daß jegliche Blasenbildung vermieden wird, womit man sonst bei den meisten Kammern zu kämpfen hat.

Neu ist ebenfalls die nach oben angeschrägte Entlüftungsöffnung 18 der 2. Dim., so daß alle Luft entweichen kann.

Dies ist möglich, weil das Gel in der Gelkammer 7 zwar vertikal steht, aber die Proteine horizontal (von rechts nach links oder von links nach rechts, je nach Wahl der Elektrodenanschlüsse) getrennt werden.

Es können in dem System auch sog. Fertiggele, d.h. dehydratisierte Gele in der Elektrophorese-Kombikammer verwendet werden.

Dabei ist auf einer Trägerfolie ein streifenförmiges Gel (1. Dimension) aufgebracht. Neben diesem Streifen ist ein flächiges Gel (2. Dimension) in einem gewissen Abstand aufgebracht.

Die Gele auf der Trägerfolie werden auf Platte 4 über den Kühlementen 3 gelegt.

Anschließend wird die äußere Dichtung 19 sowie die Isolierelemente 9 (je eine links und rechts vom Gel der ersten Dimension) eingesetzt.  
5

Die Glasplatte 5 wird aufgelegt und der Druckrahmen 13 befestigt.

Rehydratisierungslösungen für beide Gele werden in die Puffergefäß 8 und 21 eingefüllt.

10 Die Gele werden rehydratisiert. Sie quellen in derselben Kammer, in der die anschließende Elektrophorese durchgeführt wird. Nach der Rehydratisierung wird überschüssiger Puffer entfernt und die Probe aufgetragen. Danach wird der Laufpuffer für die 1. Dimension in die Einfüllöffnungen 8 und 20 eingefüllt und die Elektrophorese in der ersten Dimension ausgeführt. Danach wird 15 anstelle des Laufpuffers Reequilibrierungspuffer zur Reequilibrierung auf die Pufferbedingungen der zweiten Dimension in die Öffnungen 8 und 20 eingefüllt und nach 20 erfolgter Umpufferung der Reequilibrierungspuffer entfernt und das als Dichtungsschlauch ausgebildete Isolierelement 9 herausgezogen. Der entstehende Raum wird durch Sammelgellösung befüllt, die schnell auspolymerisiert.

25 Die Pufferlösung für die zweite Dimension wird eingefüllt und die die zweite Auftrennung wird gestartet.

30 Die Verwendung speziell entwickelter getrockneter Gele hat den Vorteil, das diese Gele in Folie eingeschweißt, leicht verpackt und verschickt werden können. Es wurden IEF-Fertiggele, in denen Ampholine als Zwitterionen 35 Verwendung finden entwickelt, die weltweit noch nicht beschrieben wurden und daher auch nicht kommerziell verfügbar sind. Aber es können in der Elektrophoresekombikammer auch immobilisierte Immobilon-Fertiggele

verwendet werden, die z.B. von der Fa. Pharmacia vertrieben werden. Im Gegensatz zu den Kammern, die Pharmacia vertreibt, können gemäß der vorliegenden Lösung diese Fertiggele auch in der erfindungsgemäßen Elektrophorese-Kombikammer rehydratisiert werden,  
5 während bei Pharmacia die Rehydratisierung in extra Schälchen gemacht wird, so daß die rehydratisierten Gele in die IEF-Kammer transferiert werden müssen. Als Innovation verwendet die vorliegende Erfindung außerdem  
10 auch Kombinationen aus beiden IEF-Geltypen; z.B. Ampholin-Fertiggele, deren Enden mit Immobilinen hergestellt wurden, so daß sich der Auftrennungsbereich auf der sauren und basischen Trennseite der IEF-Gele noch beträchtlich ausdehnen läßt.

15 Um die Trenntechnik in den erfindungsgemäßen Trennkammern zu dokumentieren, werden nachfolgend die wichtigsten Rezepte zur Auftrennung von Gelen unter speziellen Standardbedingungen wiedergegeben. Natürlich  
20 müssen je nach Proteingemisch neben den Standardbedingungen auch spezielle Bedingungen adaptiert werden.

Eine alternative Konstruktionsvariante ist die  
25 Verwendung von dünnwandigen, hochelastischen Schläuchen als Isolierelemente 9. Die Abtrennung des freibleibenden Raumes zur Aufnahme des Geles der ersten Dimension wird entweder durch einen Schlauch, der U-förmig (eventuell in einer vorgesehenen Rille in einer  
30 der Platten) eingelegt ist, realisiert oder durch zwei Schläuche, die jeweils an einem Ende verschlossen sind. Die Abdichtung erfolgt dadurch, daß der Schlauch mit einem Fluid (Flüssigkeit oder Gas) gefüllt wird. Durch ausreichenden Innendruck erfolgt die Abdichtung gegen  
35 die inneren und äußeren Platten 4 und 5. Nach dem Gießen des Stopgeles kann das Gel der ersten Dimension

gegossen werden. Die Begrenzung des Geles der zweiten Dimension erfolgt analog mit einem U-förmigen Schlauch oder einem am Ende verschlossenen Schlauch. Nach der Trennung der ersten Dimension wird der Schlauch 5 evakuiert aber nicht aus dem System entfernt. In den entstehenden Raum zwischen erster und zweiter Dimension wird Agaroselösung zur Herstellung einer elektrisch leitenden Verbindung zwischen den Gelen eingefüllt. Die anderen Abläufe erfolgen wie oben beschrieben.

10 Eine vorteilhafte Ausbildung besteht darin, daß dieser Schlauch mit einem Adhäsiv nur auf einer der Platten 4 oder 5 fixiert ist oder auf einer der Platten 4 oder 5 festsitzend in einer Nut geführt ist, so daß sichergestellt wird, daß sich der Schlauch nach der Evakuierung 15 nur auf einer Platte 4 oder 5 befindet.

Eine Variante dieser Konstruktion bzw. der Methode ist es, den Schlauch nach abgelaufener Trennung der ersten Dimension zu entfernen. Durch das Evakuieren wird die Entfernung wesentlich vereinfacht.

20 Die Kombinationskammer gemäß der zweiten Ausführungsform besteht aus zwei Teilen, die übereinander angeordnet sind, dem oberen IEF-Teil für 25 die Durchführung der IEF-Elektrophorese in der ersten Dimension und dem unteren Teil für die Durchführung der SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension.

Die Kombinationskammer besteht aus mehreren Bestandteilen, die beispielsweise durch Verschraubung 30 oder Klemmen zusammengesetzt werden. Die Rückwandplatte 28A bildet mit dem oberen Pufferreservoir 29 der zweiten Dimension sowie den Gießgefäßen 30 zum Gießen der zweiten Dimension, dem Puffergefäß 31 zum Einfüllen 35 des Puffers der zweiten Dimension eine Einheit. Die als Glasplatte ausgebildete Deckplatte 28B wird mit der Rückwandplatte 28A und dem oberen Pufferreservoir 29

z.B. durch Verschraubung verbunden. Flache Dichtungen 23 rechts und links dichten nach außen ab und legen die Dicke der Gele zwischen den Platten 28A und 28B fest. Die Platte 28B hat eine Höhe, die sich aus der Höhe der 5 Platte 28A und der Höhe des oberen Pufferreservoirs 29 ergibt. Die Platten 28A, 28B können transparent sein. Insbesondere die obere Deckplatte 28B sollte durchsichtig sein, um die einzelnen Verfahrensschritte beobachten zu können.

10 Zwischen den Umlenkelementen 22 befindet sich U-förmig ein im vorliegenden Ausführungsbeispiel als Schlauchdichtung ausgebildetes Isolierelement 24, daß das Gel 25 der ersten Dimension vom Gel 36 der zweiten Dimension trennt. Neben den Umlenkelementen 22 befinden 15 sich die Elektroden 26 und 27 für die Elektrophorese der ersten Dimension.

Die zusammengesetzte Konstruktion aus den Platten 28A, 28B und den oberen Reservoirs wird in den unteren Puffertank 32 der zweiten Dimension gestellt. Dort 20 befindet sich eine Dichtung 33, die z.B. pneumatisch angehoben werden kann (Zustand 33a), um den Leerraum zwischen den Platten 28A und 28B nach unten abzudichten, damit das Gel 36 der zweiten Dimension über eine Verbindung (z.B. einen Schlauch) aus dem Gießgefäß 30 gegossen werden kann. Das Pufferfüllgefäß 25 31 dient dem Füllen des unteren Puffertanks 32. In dem Puffergefäß 29 und dem Puffertank 32 befinden sich die Elektroden 38 und 39 der zweiten Dimension.

30 Nachfolgend soll das Zusammensetzen der Kombinationskammer beschrieben werden.

Zur Vorbereitung der 2DE werden auf eine Glasplatte 28B, aus der zwei Umlenkelemente 22, z.B. Bolzen, herausragen, rechts und links jeweils Flachdichtungen 35 23 als Spacer aus Kunststoff gelegt (vgl. Fig. 6). Die Bereiche der ersten und zweiten Dimension sind

lediglich durch ein Isolierelement 24, hier einen dehnbaren Kunststoffschlauch voneinander getrennt, der U-förmig zwischen den zwei Umlenkelementen 22 so angeordnet ist, daß sich eine gerade Abgrenzung nach unten ergibt. Er ragt an beiden Enden der oberen Kammer heraus und läßt sich leicht herausziehen. Zwischen den Umlenkelementen 22 wird im vorliegenden Ausführungsbeispiel ein IEF-Fertiggelstreifen 25 positioniert (weiße waagerechte Fläche) und in direkten Kontakt mit den beiden Elektroden 26, 27 gebracht, die bei den Umlenkelementen 22 durch die Glasplatte 28B ragen und die Elektrophorese in der ersten Dimension ermöglichen. Dann wird die obere Glasplatte 28B aufgelegt (Fig. 7) und im vorliegenden Ausführungsbeispiel mittels Klammern mit der unteren Rückwandplatte 28A und dem oberen Pufferreservoirs 29 zusammengehalten. Das Glasplattensandwich wird darauf in den Puffertank 32 gestellt (Fig. 8). Das Gießgefäß 30 dient zum Gießen des SDS-PAGE-Geles und das Reservoir 29 und der Puffertank 32 als Pufferreservoir für die SDS-PAGE, wobei der Puffertank 32 über eine Verbindungsleitung aus Pufferfüllgefäß 31 gefüllt wird.

Im Puffertank 32 befindet sich eine Dichtung 33, die beim Abdichten den Schlitz zwischen den beiden Glasscheiben 28A, 28B an der Unterseite verschließen kann. In Fig. 8 ist sie im nicht-abdichtenden Zustand dargestellt.

Die Vorbereitung und Durchführung der Elektrophorese verläuft im vorliegenden Ausführungsbeispiel wie folgt:

Das IEF-Gel 25 wird zur Rehydratisierung mit Rehydratisierungspuffer zwischen den Glasplatten 28A, 28B im Raum 34 überschichtet und rehydratisiert. Nach der Rehydratisierung (>2h) wird der überschüssige

Puffer entfernt. Dann wird die Probe in eine Aussparung 35 eingebracht, deren Platz durch Einbringung eines Spacer-Einsatzes während der Rehydratisierung ausgespart blieb. Dann wird die Elektrophorese durch 5 Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden 26, 27 durchgeführt. Nach der Durchführung der IEF-Elektrophorese wird das IEF-Gel 25 durch Zusatz von Reequilibrierungspuffer, der in Raum 34 eingebracht wird, umgepuffert (z.B. 30 min, bei pH 6,9).

10

Das SDS-Gel 36 für die zweite Dimension wird vor, nach oder während der Durchführung der ersten Dimension gegossen, indem die Gellösung über das Gießgefäß 30 eingefüllt wird und durch eine Leitung nach unten zwischen die Glasplatten 28A, 28B geleitet wird (Fig. 15 9). In diesem Zustand dichtet die Dichtung 33A das Glasplatten-Sandwich nach unten ab, so daß die Gellösung nicht auslaufen kann. Das Gel 36 wird zwischen den Glasplatten 28A, 28B für mindestens zwei 20 Stunden polymerisiert. Danach wird die Abdichtung durch die Dichtung 33A wieder aufgehoben, so daß das SDS-Gel mit dem Elektophoresepuffer im Puffertank 32 in Verbindung tritt.

25

Nach Beendigung der IEF-Elektrophorese und erfolgter Umpufferung des Gelstreifens 25 wird der Reequilibrierungspuffer aus dem Raum 34 entfernt, der Kunststoffschlauch 24 aus der Apparatur seitlich nach oben z.B. mit einem Schrittmotor herausgezogen und der entstehende Zwischenraum 37 zwischen erster und zweiter 30 Dimension mit Kontaktgel (z.B. Agarose-Sammelgel) befüllt (Fig. 5). Dann wird Puffer in das Pufferreservoir 29 und den Puffertank 32 eingefüllt und über ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden 38, 39 der zweiten Dimension in den mit Puffer gefüllten 35 Puffergefäßen 29, 32 die SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt. Nach Ende der

Elektrophorese wird das Platten-Sandwich herausgenommen, das Gel abgehoben und nach bekannten Methoden entwickelt, z.B. mit Silbernitratlösung oder Coomassielösung angefärbt.

Die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen erfolgt durch Eintauchen der Gelsandwiche in thermostatisierte Pufferlösung der zweiten Dimension, die sich in dem Puffertank 32 befindet, oder es werden die Kammersandwiche durch an die Glasplatten 28A, 28B angelegte Kühlkammern gekühlt.

Gegenstand der Erfindung sind auch neue IEF-Gele (isoelektrische Fokussierungsgele) gemäß der Ansprüche 24 bis 29, die einen hervorragenden Trenneffekt für Biomoleküle bieten, insbesondere für Proteine, und einen erweiterten Auftrennungsbereich auf der sauren und basischen Trennseite. Nachfolgend werden ausgewählte Rezepte von Gelen dokumentiert.

20

#### Standard-Rezepte

##### Ampholin-Fertiggele (hydratisiertes Gel)

3.5 - 4% Acrylamidgel mit 9 M Harnstoff mit minimal 2% 25 Ampholinen (WITA Ampholyte), pH-Bereich pH 2.0 bis 11.0 (mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff)

##### Ampholin-Immobilon-Fertiggele (hydratisiertes Gel)

3.5 - 4% Acrylamidgel mit 9 M Urea mit minimal 2% 30 Ampholinen (WITA Ampholyte), pH-Bereich pH 2.0 bis 11.0 (mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff)

seitliche Immobilingele: 10% Acrylamidgel unter Zusatz von 50 mM bis 100 mM Immobilinen

SDS-Gel, 2. Dimension:

5

SDS-PAGE mit 15% Acrylamid, 0,1% SDS, Tris/HCl-Puffer, pH 8,8

10

Rehydratisierungspuffer

9M Harnstoff, 2-4% Ampholine, pH Bereich 2-11  
(mit oder ohne Zusatz von Detergenzien und Thioharnstoff)

15

Reequilibrierungspuffer

20

Agarose Sammelgel

25

0,1% SDS, 1% Agarose, Tris/Phosphat, pH 6,8

30

Elektrophorese-Puffer 1. Dimension

Puffer A: 4% (v/v) Phosphorsäure

Puffer B: 5% (v/v) Ethylendiamin

Elektrophoresepuffer 2. Dimension

SDS-Laufpuffer: 192mM Glycin, 25 mM Tris-Base, 0,1% SDS

35

Laufbedingungen:1. Dimension:

5	1h	100V
	1 h	200 V
	17,5 h	400 V
	1 h	600 V
	0.5 h	800 V
	10 min	1500 V
10	5 min	2000 V

2. Dimension:

15	30 min	40 mM
	6 h	80 mM

Die Erfindung ist nicht beschränkt auf die hier dargestellten Ausführungsbeispiele. Vielmehr ist es möglich, durch Kombination und Modifikation der genannten Mittel und Merkmale weitere Ausführungsvarianten zu realisieren, ohne den Rahmen der Erfindung zu verlassen.

**Bezugszeichenliste**

- |  |  |
|--|--|
| 1 Elektrophorese-Kombikammer                                     | 15 Spannelemente                               |
| 2 Kern   | 16 Sichtfenster                                |
| 3 Kühlelemente   | 17a Füllkammern für die 1. Dimension           |
| 4 innere Platte  | 17b Füllkammer mit Einlaß für die 2. Dimension |
| 5 äußere Platte  | 18 Entlüftungsöffnungen                        |
| 6 Gelkammer  | 19 Flächendichtung                             |
| 7 Gelkammer  | 20. Einfüllöffnung für Probe und 1. Dim. Gel   |
| 8 Puffergefäß und Füllkammer für die 1. Dimension samt Einlässen | 21. Puffergefäß samt Einlässe für 2. Dimension |
| 9 Isolierelemente  | 22 Umlenkelement                               |
| 10 Kühlabyrinth  | 23 Dichtung                                    |
| 11 Zulauf Kühlflüssigkeit  | 24 Isolierelemente                             |
| 12 Ablauf Kühlflüssigkeit  | 25 Gel der ersten Dimension                    |
| 13 Druckrahmen   | 26 Elektrode der ersten Dimension              |
| 14 Deckel  |  |

- |     |   |    |   |
|-----|---|----|---|
| 27  | Elektrode der ersten Dimension  | 35 | Aussparung im Gel der ersten Dimension für Probenauftrag                  |
| 28A | Rückwandplatte  | 36 | Gel der zweiten Dimension   |
| 28B | Deckplatte  | 37 | Zwischenraum zwischen Platten (28A, 28B), der mit Kontaktgel gefüllt wird |
| 29  | oberes Pufferreservoir der zweiten Dimension  | 38 | Elektrode im oberen Puffergefäß für Elektrophorese der zweiten Dimension  |
| 30  | Gießgefäß der zweiten Dimension   | 39 | Elektrode im unteren Puffergefäß für Elektrophorese der zweiten Dimension |
| 31  | Pufferfüllgefäß der zweiten Dimension   |    |   |
| 32  | unterer Puffertank der zweiten Dimension  |    |   |
| 33  | Dichtung (kann z.B. pneumatisch angehoben werden)   |    |   |
| 33A | Dichtung (ist z.B. pneumatisch angehoben)   |    |   |
| 34  | Raum zwischen Platten (28A, 28B) über der Schlauchdichtung (24), der zur Rehydratisierung und Umpufferung des Gels der ersten Dimension mit Puffer gefüllt wird |    |   |

**Patentansprüche**

- 5        1. Verfahren zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in Gelen, Polymerträgern durch Elektrophorese in einer Elektrophoreseapparatur, wobei
- 10      - die Gele für die Trennung in der ersten Dimension und die Gele für die Trennung in der zweiten Dimension nacheinander oder gleichzeitig vertikal zueinander angeordnet als Gießgele oder Fertiggele in eine Elektrophorese-Kombikammer eingebracht und voneinander isoliert polymerisiert bzw. rehydratisiert werden,
- 15      - nachfolgend Pufferlösungen eingefüllt, ein Biomolekülgemisch auf die Gele der ersten Dimension aufgetragen und die elektrophoretische Auftrennung der ersten Dimension bei konstanter Temperatur oder bei fixiertem Temperaturgradienten durchgeführt,
- 20      - anschließend die Pufferlösung abgesaugt, die Isolierung aufgehoben, in die entstehenden Räume zwischen erster und zweiter Dimension Kontaktgel eingefüllt und auspolymerisiert, Pufferlösungen eingefüllt und die elektrophoretische Trennung der zweiten Dimension bei präzise eingestellter Temperatur und konstanter elektrischer Leistung oder steigender Stromstärke durchgeführt wird und
- 25      - abschließend die Gele entwickelt und die Proteine mit herkömmlichen Methoden sichtbar gemacht werden.
- 30

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

zur Trennung die Gele in der Elektrophorese-Kombikammer vertikal stehen und die Trennung der Proteine in der ersten Dimension vertikal und in der zweiten Dimension horizontal erfolgt.

5

3. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

10

die Gele der ersten Dimension als Flachgele in einem U-förmigen Rohr gegossen werden, wobei zuerst ein Stoppgel und nachfolgend das Separationsgel gegossen wird und sowohl Gießvorgänge als auch Polymerisationsvorgänge bei konstanter Temperatur mit aktivierter Kühlung erfolgen.

15

4. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

20

die Gele der zweiten Dimension in zwei Schritten gegossen werden derart, daß in einem ersten Schritt ein Dichtgel und nach dessen Polymerisation in einem zweiten Schritt die Gellösung von unten aufsteigend gegossen wird derart, daß die Luft nach oben verdrängt und das Gel anschließend bei konstanter Temperatur mit aktivierter Kühlung polymerisiert wird.

25

5. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

30

die Gele in variabler Breite und Dicke erzeugt werden.

6. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Aufhebung der Isolierungen durch körperliches Entfernen von Dichtungen oder Schalten mittels -  
5 Volumen- oder Durchmesserverringerungen von Dichtungsschläuchen realisiert wird.

7. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß

10 der Ablauf der zweidimensionalen Elektrophorese automatisiert durchgeführt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 3,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 die Gele und die Pufferlösungen von der gleichen Kühlung temperiert werden.

9. Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Substanzgemischen in  
20 Gelen durch Elektrophorese in einer Elektroden aufweisenden Elektrophoreseapparatur,

dadurch gekennzeichnet, daß

eine Elektrophorese-Kombikammer (1) einen Kern (2) mit Kühlelementen (3) aufweist, wobei die Kühlelemente (3) zwischen den beidseitig des Kerns (2) durch innere Platten (4) und äußere Platten (5) im Zusammenwirken mit entfernbarer oder schaltbarer Isolierelementen (9) gebildeten Gelkammern (6,7) und Puffergefäß (8) angeordnet sind.  
25

10. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Kühlelemente (3) durch ein mäanderförmiges  
Kühllabyrinth (10) mit Zulauf (11) und Ablauf (12)  
gebildet sind und das Kühllabyrinth (10) die  
Puffergefäß (8) und (21) umschließt, wobei die  
inneren Platten (4) aus einem gut tempera-  
turleitenden Material und die äußeren Platten (5)  
aus einem transparenten Material bestehen.

10

11. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

die inneren Platten (4) aus Keramik oder Kunststoff  
und die äußeren Platten (5) aus Glas oder  
transparentem Kunststoff bestehen und die äußeren  
Platten (5) durch einen Druckrahmen (13) gehalten  
werden und ein Deckel (14) die Elektrophorese-  
Kombikammer (1) nach oben abschließt.

15

20

12. Vorrichtung nach Anspruch 11,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Druckrahmen (13) über Spannelemente (15)  
beidseitig befestigt wird und Sichtfenster (16) zur  
Prozeßkontrolle aufweist.

25

13. Vorrichtung nach Anspruch 9 oder 11,

dadurch gekennzeichnet, daß

30

die untere Begrenzung der Elektrophorese-  
Kombikammer (1) durch einen justier- und drehbaren  
Tisch realisiert ist, auf welchem die Elektro-  
phorese-Kombikammer (1) fixiert ist und der Deckel

(14) Ein- und Ausleitungen für das Kühlmedium sowie zu den Puffergefäßen (8, 21) und Gelkammern (6, 7) und die Anschlüsse für die Elektroden der erste und zweite Dimension aufweist.

5

14. Vorrichtung nach Anspruch 9,

dadurch gekennzeichnet, daß

der Kern (2) aus Polymermaterial wie Acrylglas, Keramik oder Plexiglas besteht und die Gelkammern (6, 7) mit Füllrohren (17) verbunden sind und Entlüftungsöffnungen (18) angeordnet sind und zwischen inneren Platten (4) und äußeren Platten (5) Dichtungen (19) angeordnet sind und die Isolierelemente (9) mit Vertiefungen zusammenwirken und die die Medien Gele und/oder Gellösungen und/oder Pufferlösungen berührenden Teile der Elektrophorese-Kombikammer (1) oberflächenbeschichtet sind, wobei die Oberflächenbeschichtung aus amorphen Kohlenstoffschichten bestehen kann.

10

15

20

15. Vorrichtung zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Substanzgemischen in Gelen, Polymeren oder trägerfreien Medien durch Elektrophorese in einer Elektrophoresearratur,

dadurch gekennzeichnet,

daß alle für die Durchführung einer zwei-dimensionalen Trennung notwendigen Baugruppen in einer Elektrophorese-Kombikammer (1), bestehend aus einem Kern (2) mit Kühlelementen (3), wobei die Kühlelemente (3) zwischen den beidseitig des Kerns durch innere Platten (4) und äußere Platten (5) im Zusammenwirken mit entfernbarer oder schaltbaren Isolierelementen (9) gebildeten Trennkammern (6,

25

30

7), Puffergefäß (8, 21) und Aufnahmen für Elektroden angeordnet sind, vollständig integriert sind und die Durchführung der zwei-dimensionalen Auftrennung vollständig automatisiert werden kann, ohne daß im Ablauf der zwei-dimensionalen Trennung eine Manipulation an den Gelen selber erfolgt.

16. Kombinationskammer zur zweidimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in waagerecht übereinander angeordneten Gelen durch Elektrophorese mit einer Rückwandplatte (28A) und einer Deckplatte (28B), wobei zwischen Rückwandplatte (28A) und Deckplatte (28B) mindestens zwei Umlenkelemente (22) zur Führung von Isolierelementen (24) angeordnet sind.

17. Kombinationskammer nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammeranordnung aus einem oberen IEF-Teil für die Durchführung der IEF-Elektrophorese in der ersten Dimension und einem unteren Teil für die Durchführung der SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension besteht und die Gele (25) und (36) waagerecht übereinander angeordnet sind und die Platten (28A, 28B) nach außen durch Dichtungen (23) abgedichtet werden und die Gestaltung der Dichtungen (23) die Dicke der Gele (25, 36) festlegt und neben den Umlenkelementen (22) Elektroden (26, 27) für die Elektrophorese der ersten Dimension eingelassen sind, wobei die Platte (28A) aus Keramik oder Glas besteht und die Platte (28B) eine transparente Platte ist.

18. Kombinationskammer nach Anspruch 16,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Rückwandplatte (28A) mit dem oberen Pufferreservoir (29) der zweiten Dimension sowie dem Gießgefäß (30) und dem Pufferfüllgefäß (31) eine Einheit bildet und die zusammengesetzte Konstruktion aus den Platten (28A, 28B) und dem oberen Pufferreservoir (29), dem Gießgefäß (30) und dem Pufferfüllgefäß (31) in den unteren Puffertank (32) gestellt angeordnet ist und eine Dichtung (33) angeordnet ist, welche anhebbar ausgebildet ist und in dem oberen Pufferreservoir (29) und in dem unteren Puffertank (32) Elektroden (38, 39) für die Elektrophorese der zweiten Dimension angeordnet sind.

19. Verfahren zur zwei-dimensionalen Trennung von Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen in Gelen oder Polymerträgern durch Elektrophorese in einer Elektrophorese-Kombinationskammer, wobei

- ein IEF-Gel in der Kombinationskammer waagerecht angeordnet und zur Rehydratisierung mit Rehydratisierungspuffer überschichtet wird,
- nachfolgend eine Biomolekül- oder Stoffgemischprobe am IEF-Gel eingebracht oder am IEF-Gel angebracht und die Elektrophorese der ersten Dimension durchgeführt wird,
- vor, nach oder während der Durchführung der ersten Dimension ein SDS-Gel für die Durchführung der zweiten Dimension waagerecht zu dem IEF-Gel und von diesem isoliert in die Kombinationskammer eingebracht und das SDS-Gel polymerisiert wird,

- nach Beendigung der IEF-Elektrophorese die Isolierung aufgehoben, in die hierdurch entstehenden Räumen Kontaktgel eingeführt, Pufferlösung zugeführt und die SDS-Elektrophorese in der zweiten Dimension durchgeführt wird und anschließend die Gele nach bekannten Methoden entwickelt und angefärbt werden.

5 20. Verfahren nach Anspruch 19,

10 dadurch gekennzeichnet, daß

nach der Rehydratisierung des IEF-Gels überschüssige Pufferlösung entfernt wird und die Aussparung im IEF-Gel durch Einbringen eines Spacer-Einsatzes während der Rehydratisierung erzeugt wird und das IEF-Gel nach der Elektrophorese durch Zusatz von Reequilibrierungspuffer umgepuffert wird und die Isolierung durch Entfernen eines Kunststoffschlauches durch Herausziehen mittels 15 eines Schrittmotors aufgehoben wird.

20

21. Verfahren nach Anspruch 19,

dadurch gekennzeichnet, daß

25 die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen durch Eintauchen der Gelsandwiche in thermostatierte Pufferlösung der zweiten Dimension erfolgt oder die Kühlung beider Elektrophorese-Dimensionen durch in der Kombinationskammer angeordnete Kühlkammern realisiert wird.

30

22. Verfahren nach Anspruch 19,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die Biomolekül- oder Stoffgemischprobe in eine  
Aussparung im IEF-Gel eingebracht wird.

5

23. Verfahren zur ein-dimensionalen Trennung von  
Biomolekülen oder anderen Stoffgemischen durch  
Elektrophorese,

dadurch gekennzeichnet, daß

- 10 - anstelle des Gels für die Trennung in der ersten Dimension sowie des Isolierelementes ein Kamm mit Probentaschen für verschiedene Proben in das SDS-Gel eingesetzt und dieses auspolymerisiert wird,
- 15 - der Kamm nach dem Auspolymerisieren entfernt ,  
- die Proben in die entstandenen Aussparungen eingebracht und  
- nachfolgend die ein-dimensionale Elektrophorese durchgeführt wird.

20

24. Hydratisiertes IEF-Gel hergestellt durch Gießen eines Immobilin-Gels mit niedrigem pK auf einer Gelpolymerisationsfolie und dessen Polymerisation, Gießen eines Acrylamidgels auf dem Immobilin-Gel und dessen Anpolymerisation, Gießen eines Immobilin-Gels mit hohem pK auf dem Acrylamidgel und dessen Anpolymerisation und nachfolgendes Rehydratisieren mittels eines Rehydratisierungs-puffers, der 1-4% von solchen Ampholinen enthält, die einen pH-Bereich innerhalb von 2-11, ermöglichen.

25. IEF-Gel nach Anspruch 24,

dadurch gekennzeichnet, daß

die Immobilin-Gele aus 6-10%, vorzugsweise 10%,  
Acrylamid unter Zusatz von 50-200 mM, vorzugsweise  
5

50-100 mM, Immobilin hergestellt sind.

26. IEF-Gel nach Anspruch 24,

dadurch gekennzeichnet, daß

10 das Acrylamidgel aus 3,5-4,5%, vorzugsweise 3,5-4%,  
Acrylamid hergestellt ist.

27. IEF-Gel nach Anspruch 24,

dadurch gekennzeichnet, daß

15 der Rehydratisierungspuffer von 5-9,5 M,  
vorzugsweise 9 M, Harnstoff und gegebenenfalls  
Detergenzien, vorzugsweise Tween 20, Chaps oder  
Triton X-100 enthält.

28. IEF-Gel nach Anspruch 24,

20 dadurch gekennzeichnet, daß

vor der Rehydratisierung gegebenenfalls  
Waschschrifte durchgeführt werden und getrocknet  
wird.

25 29. Trockengel hergestellt durch Gießen eines  
Immobilin-Gels mit niedrigem pK auf einer  
Gelpolymerisationsfolie und dessen Polymerisation,  
Gießen eines Acrylamidgels auf dem Immobilin-Gel  
und dessen Anpolymerisation, Gießen eines  
30 Immobilin-Gels mit hohem pK auf dem Acrylamidgel  
und dessen Anpolymerisation.

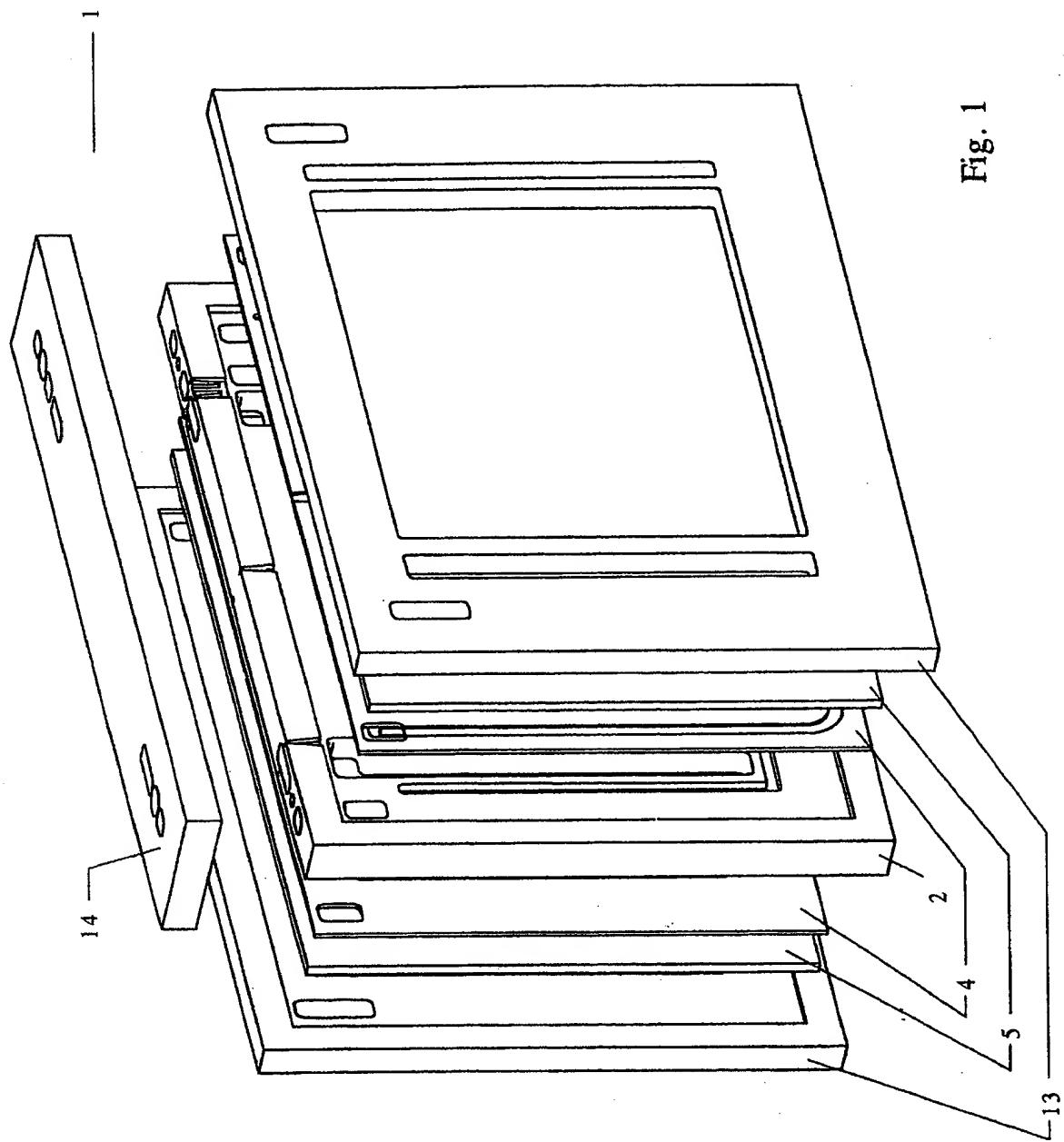
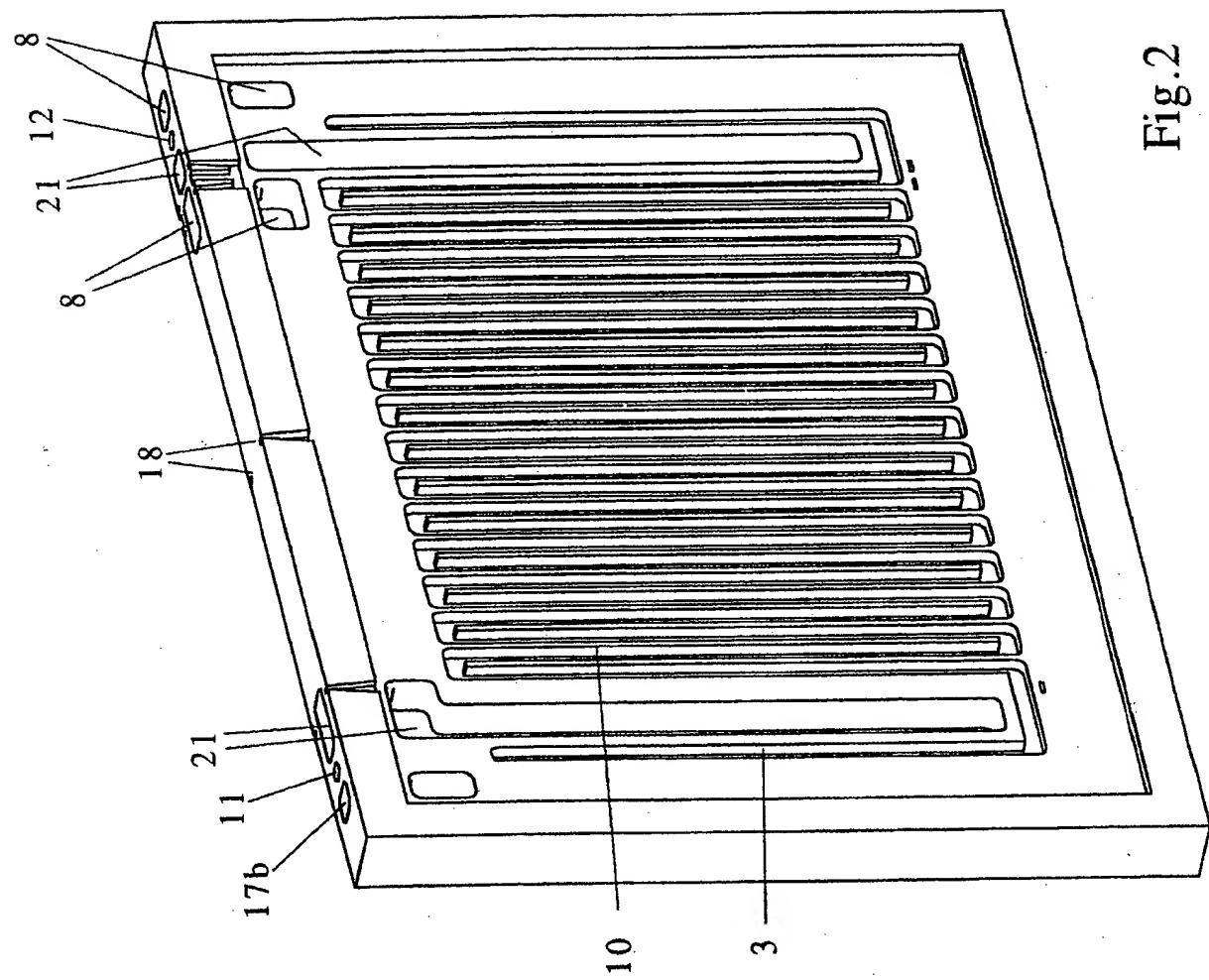


Fig. 1



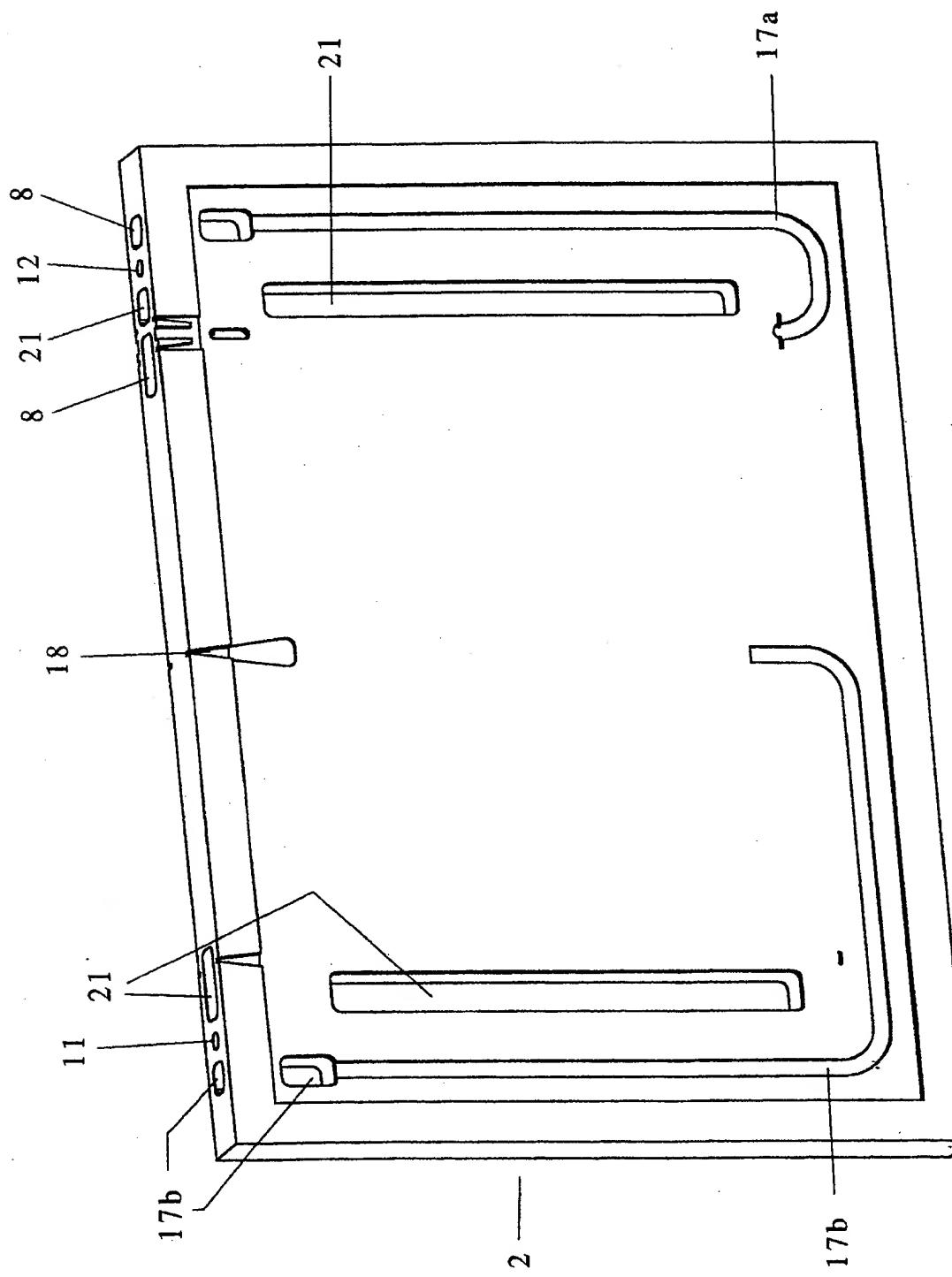


Fig.3

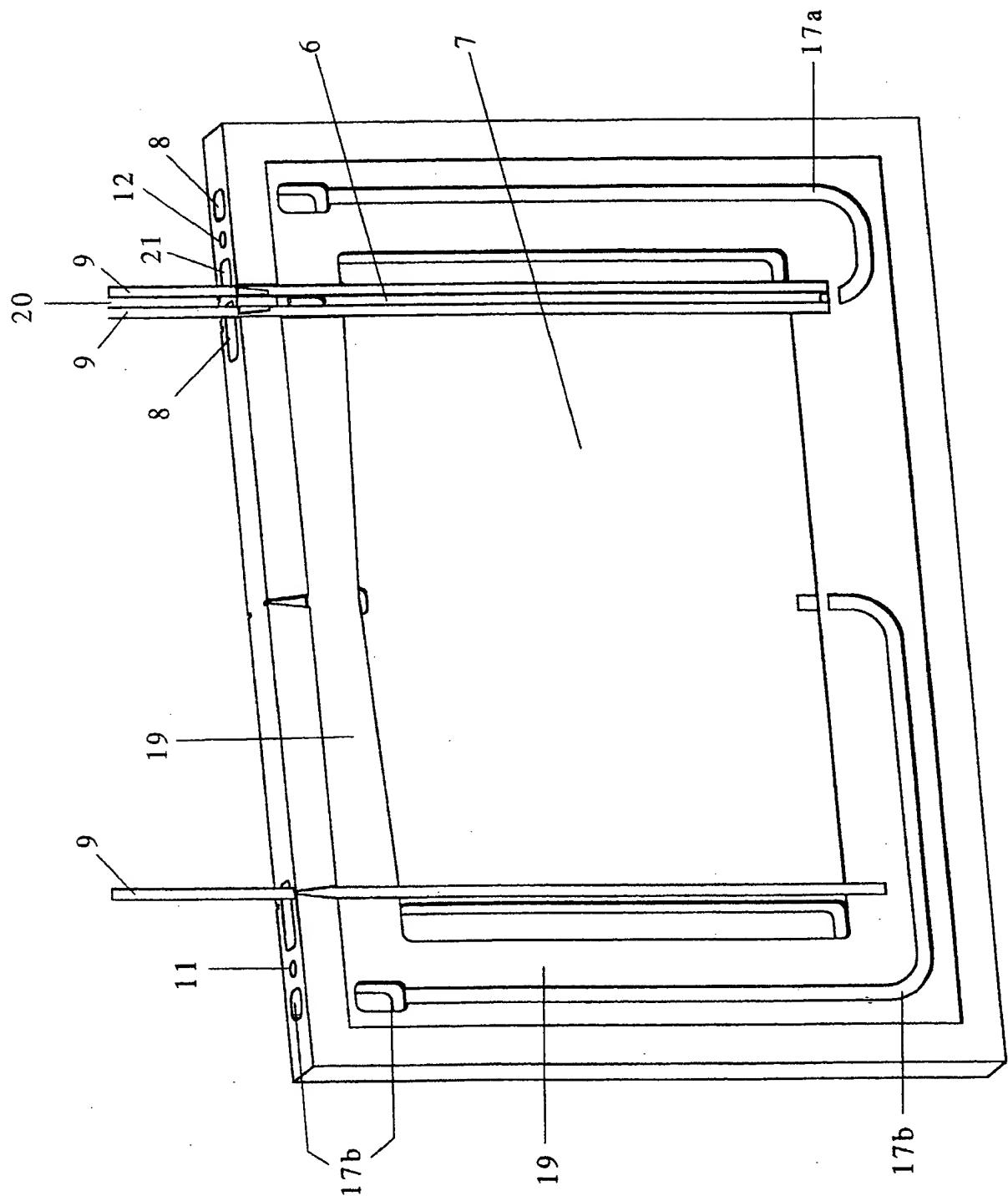


Fig. 4

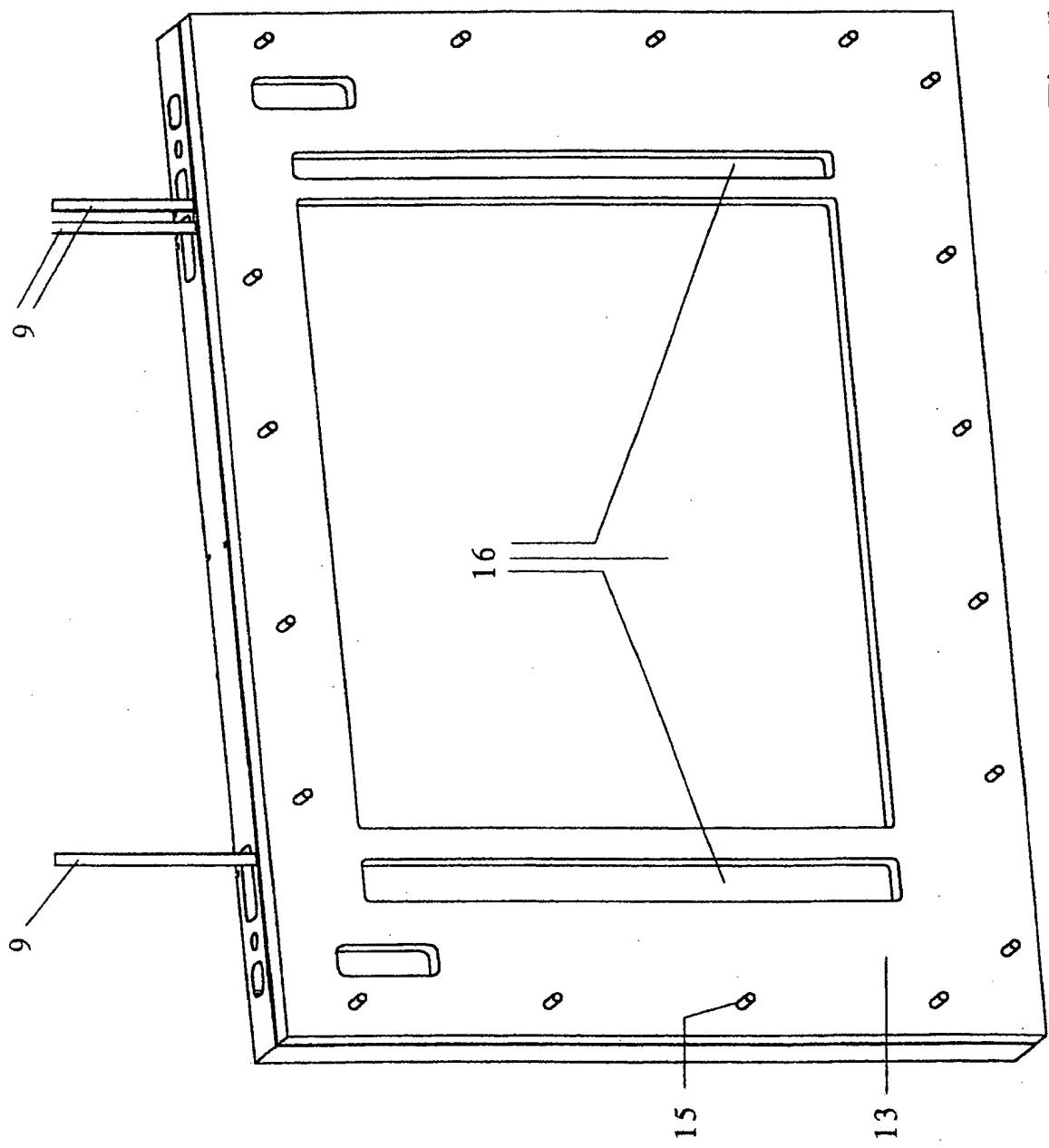


Fig.5

Fig. 6:

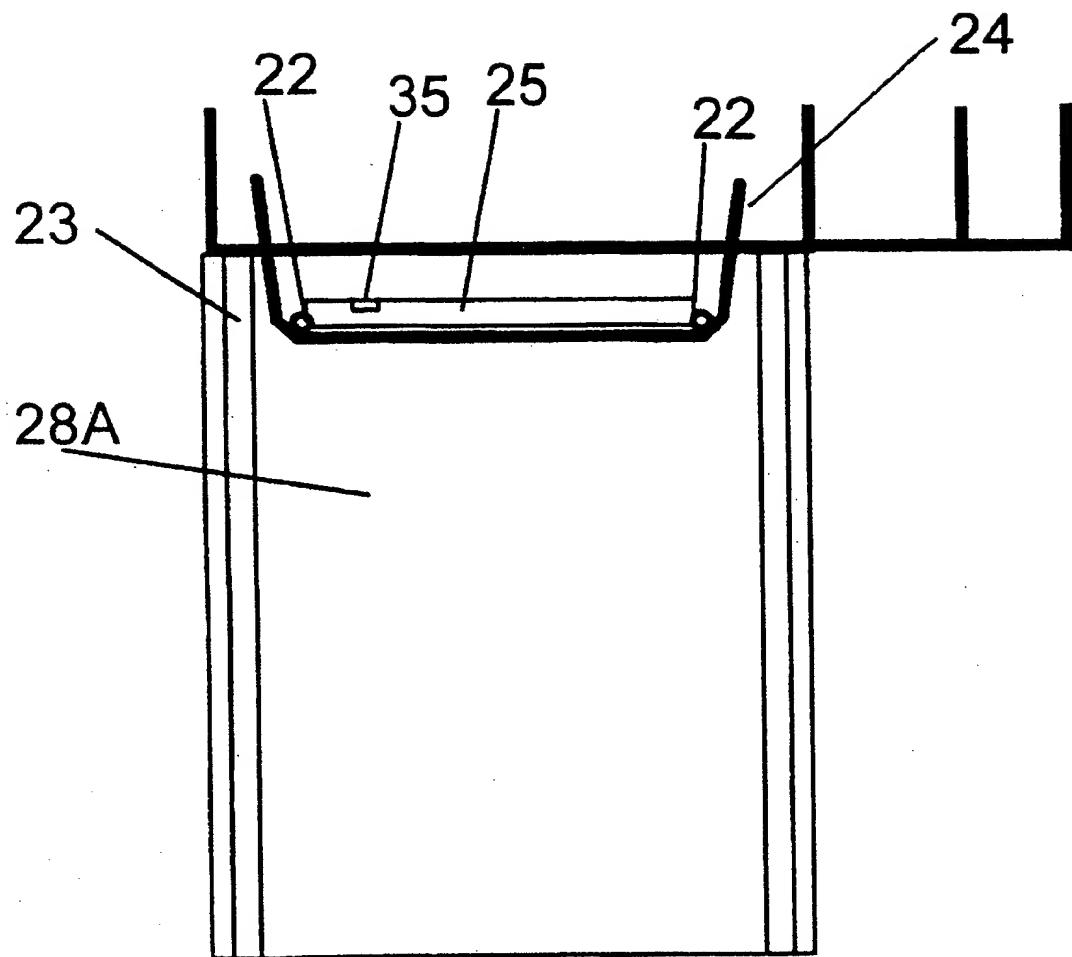


Fig. 7:

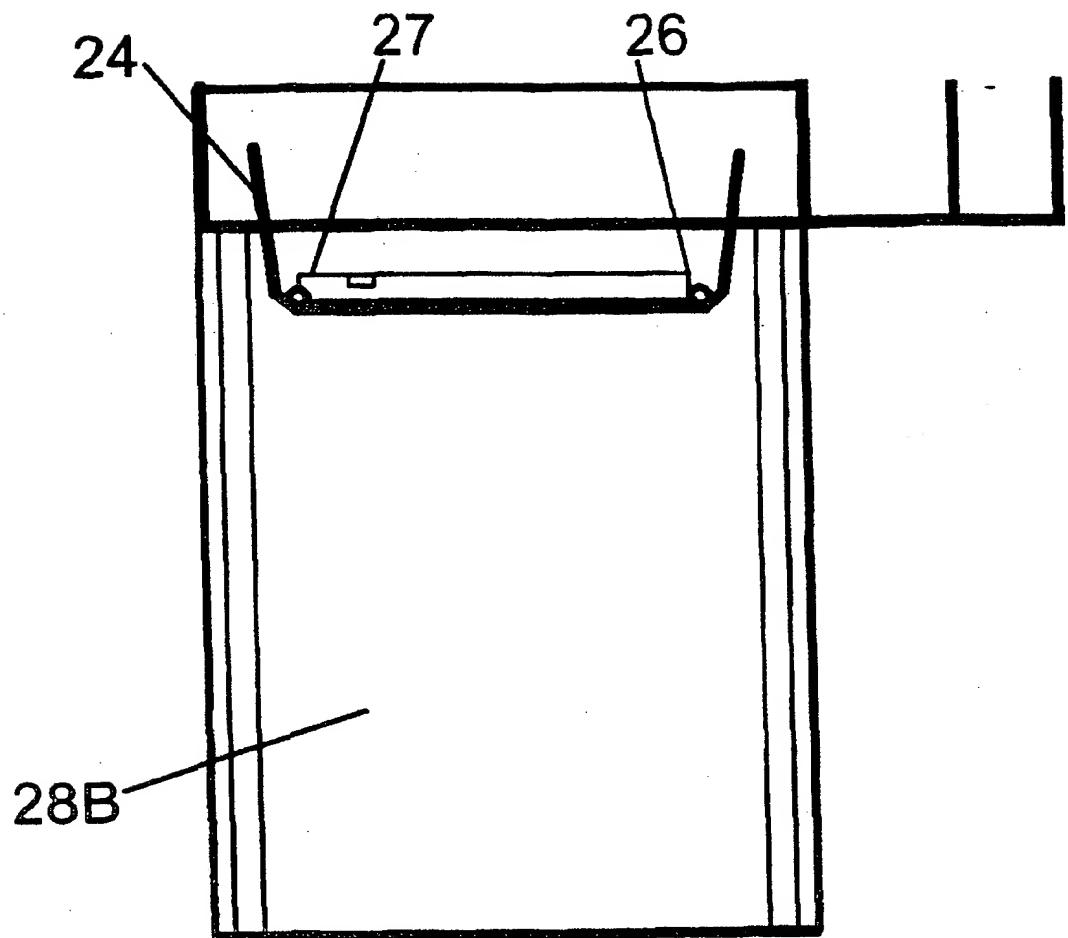


Fig. 8:

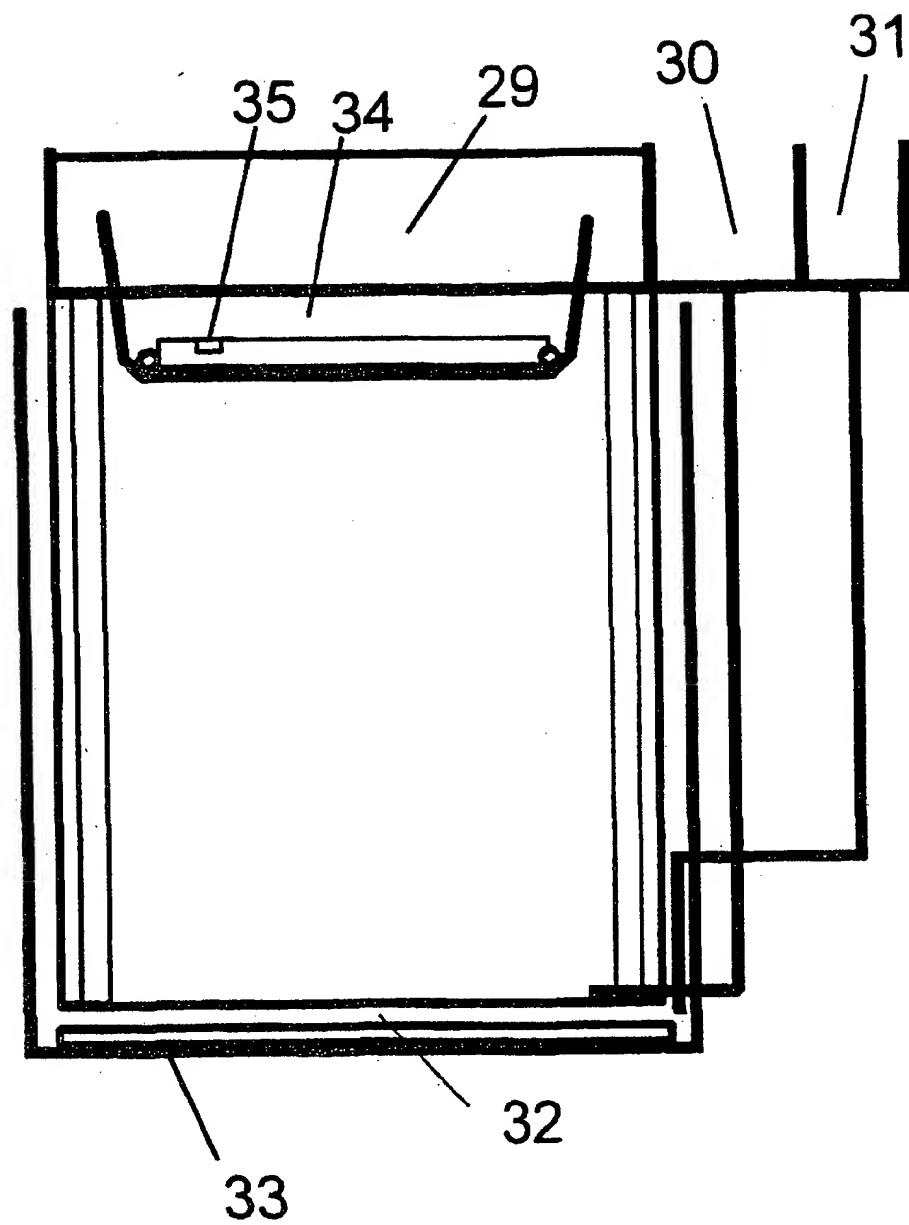


Fig. 9:

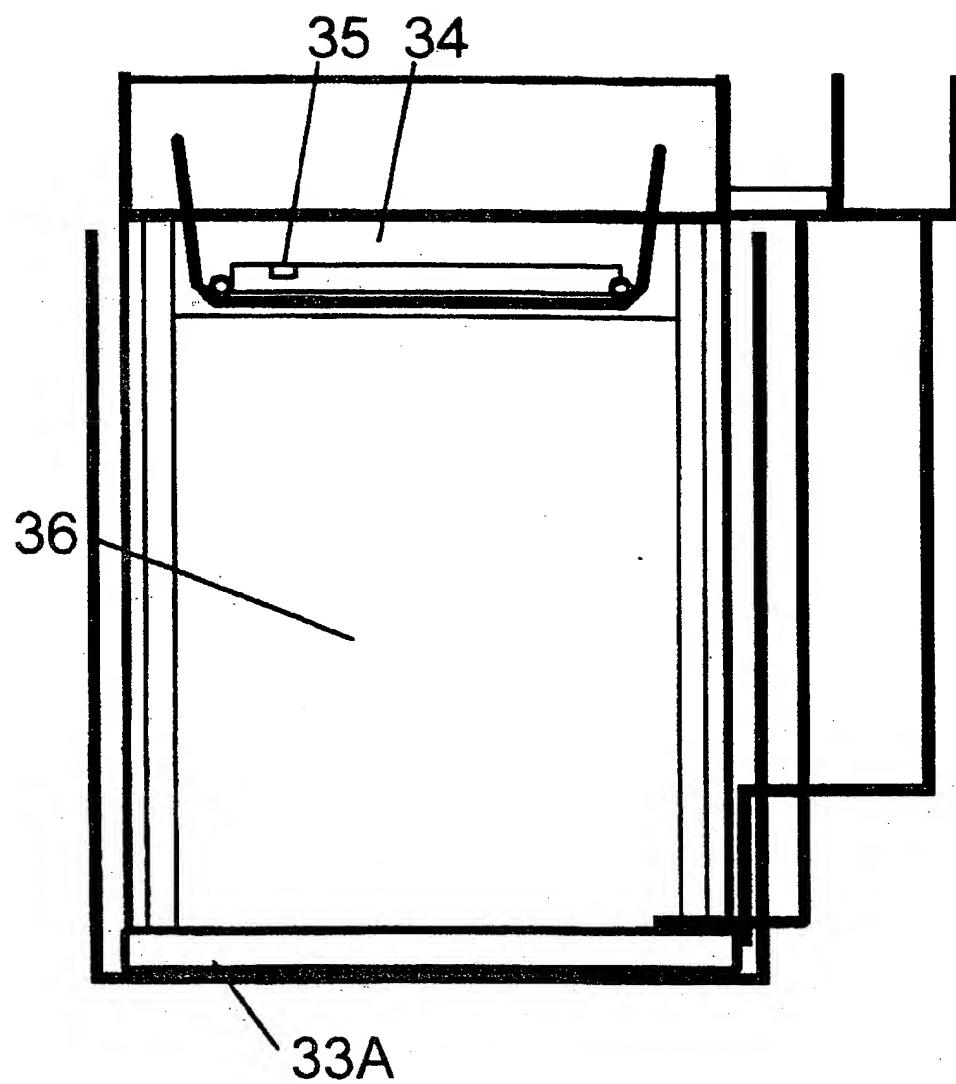
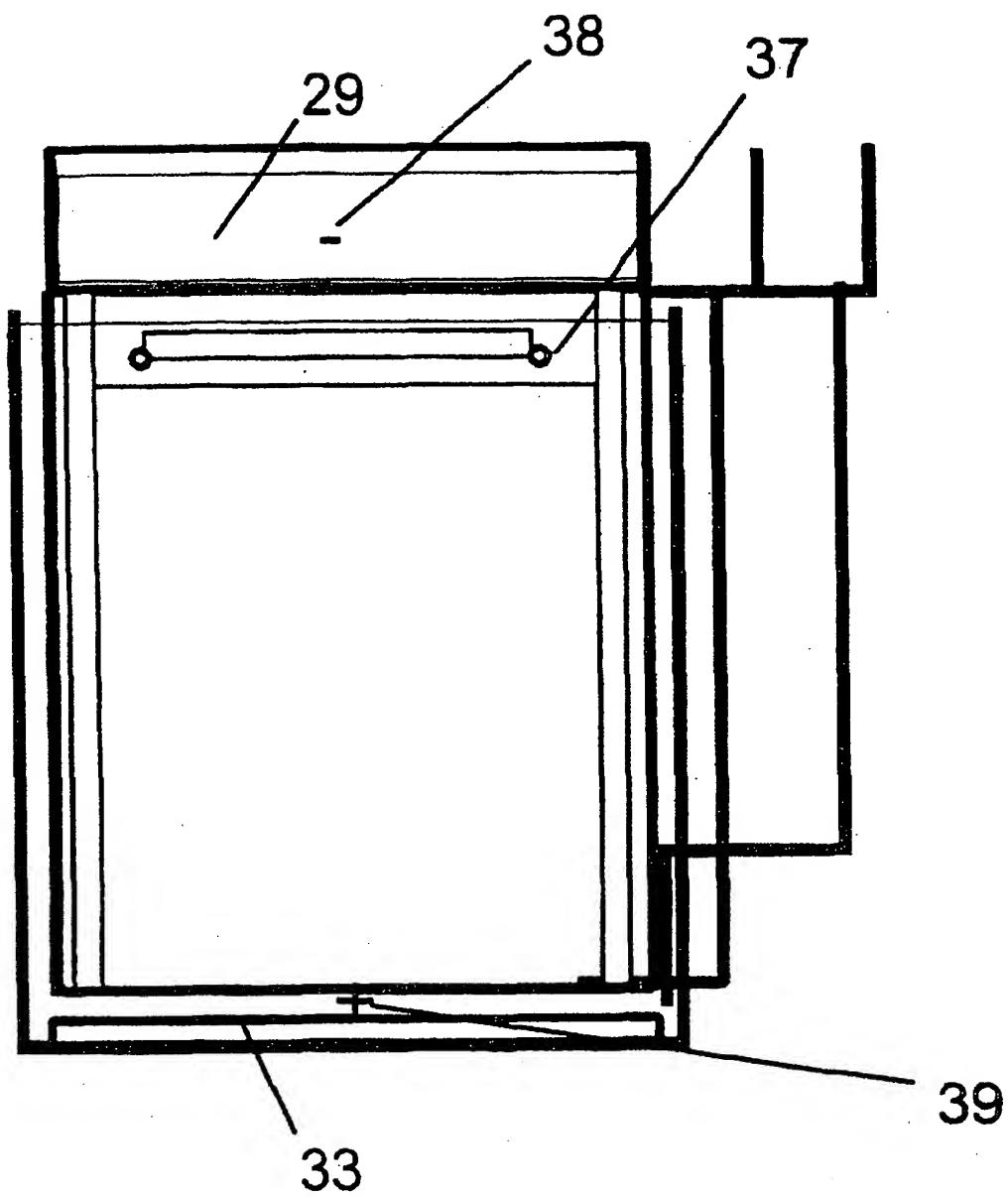


Fig. 10:



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/04411

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N27/447 C07K1/26 B01D57/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 37 35 872 A (SCHUETT LABORTECHNIK GMBH) 3 August 1989 (1989-08-03)  the whole document ---	1,9,15, 16,19, 23,24,29
A	WO 92 00795 A (SERVA FEINBIOCHEM GMBH & CO) 23 January 1992 (1992-01-23)  figure 1 ---	1
A	US 4 385 974 A (SHEVITZ JERRY) 31 May 1983 (1983-05-31) abstract column 9, line 24 ---	1,24,25
A	US 3 803 020 A (STEPHAN W) 9 April 1974 (1974-04-09) abstract; figure 1 ---	1
		-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1999

Date of mailing of the international search report

02/12/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Duchatellier, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	rnational Application No
PCT/EP 99/04411	

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 171 680 A (FLOSSER HANS) 19 February 1986 (1986-02-19) abstract; figure 1 ----	9
A	EP 0 287 513 A (CIBA GEIGY AG) 19 October 1988 (1988-10-19) column 14, line 12 - line 18 ----	24, 25, 29
A	WO 98 25136 A (TEASDALE ROBERT DIXON ;FORBIO RES PTY LTD (AU)) 11 June 1998 (1998-06-11) page 1, line 19 - line 25 page 4, line 17 - line 25 ----	23
A	US 4 874 490 A (HOCHSTRASSER DENIS F) 17 October 1989 (1989-10-17) cited in the application abstract; figure 2 ----	1
✓ A	US 4 666 581 A (ITOH MICHIO ET AL) 19 May 1987 (1987-05-19) cited in the application column 3, line 30 - line 31 -----	24

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/04411

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 3735872	A	03-08-1989	NONE		
WO 9200795	A	23-01-1992	DE EP	4021728 A 0539399 A	09-01-1992 05-05-1993
/ US 4385974	A	31-05-1983	NONE		
✓ US 3803020	A	09-04-1974	AT AT BE CH DE DK FR GB IT JP JP NL SE	330723 B 601972 A 787105 A 576140 A 2140417 A 128858 B 2148642 A 1368403 A 962641 B 48031992 A 52043598 B 7208660 A, B 386980 B	12-07-1976 15-10-1975 01-12-1972 31-05-1976 27-07-1972 15-07-1974 23-03-1973 25-09-1974 31-12-1973 26-04-1973 31-10-1977 14-02-1973 23-08-1976
EP 0171680	A	19-02-1986	DE JP	3430064 A 61057848 A	27-02-1986 24-03-1986
EP 0287513	A	19-10-1988	AT CA DE DK FI GR HK IE JP JP PT US US	83077 T 1335805 A 3876273 A 191388 A 881652 A, B, 3007124 T 192495 A 62803 B 2049305 C 7081987 B 63263457 A 87210 A, B 4971670 A 5082548 A	15-12-1992 06-06-1995 14-01-1993 12-10-1988 12-10-1988 30-07-1993 29-12-1995 08-03-1995 25-04-1996 06-09-1995 31-10-1988 12-05-1989 20-11-1990 21-01-1992
WO 9825136	A	11-06-1998	AU	5185198 A	29-06-1998
✓ US 4874490	A	17-10-1989	DE DE EP JP JP	68918550 D 68918550 T 0366897 A 2151758 A 2701943 B	03-11-1994 02-02-1995 09-05-1990 11-06-1990 21-01-1998
✓ US 4666581	A	19-05-1987	JP JP JP JP	60236057 A 1842625 C 5048421 B 61104248 A	22-11-1985 12-05-1994 21-07-1993 22-05-1986

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/04411

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G01N27/447 C07K1/26 B01D57/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprässtoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprässtoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 37 35 872 A (SCHUETT LABORTECHNIK GMBH) 3. August 1989 (1989-08-03)  das ganze Dokument ---	1, 9, 15, 16, 19, 23, 24, 29
A	WO 92 00795 A (SERVA FEINBIOCHEM GMBH & CO) 23. Januar 1992 (1992-01-23) Abbildung 1 ---	1
A	US 4 385 974 A (SHEVITZ JERRY) 31. Mai 1983 (1983-05-31) Zusammenfassung Spalte 9, Zeile 24 ---	1, 24, 25
A	US 3 803 020 A (STEPHAN W) 9. April 1974 (1974-04-09) Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1
		-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- ° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prüfungsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

25. November 1999

02/12/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Duchatellier, M

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 99/04411

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 171 680 A (FLOSSER HANS) 19. Februar 1986 (1986-02-19) Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	9
A	EP 0 287 513 A (CIBA GEIGY AG) 19. Oktober 1988 (1988-10-19) Spalte 14, Zeile 12 - Zeile 18 ---	24, 25, 29
A	WO 98 25136 A (TEASDALE ROBERT DIXON ;FORBIO RES PTY LTD (AU)) 11. Juni 1998 (1998-06-11) Seite 1, Zeile 19 - Zeile 25 Seite 4, Zeile 17 - Zeile 25 ---	23
A	US 4 874 490 A (HOCHSTRASSER DENIS F) 17. Oktober 1989 (1989-10-17) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 2 ---	1
A	US 4 666 581 A (ITOH MICHIO ET AL) 19. Mai 1987 (1987-05-19) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 30 - Zeile 31 -----	24

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/04411

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 3735872	A	03-08-1989	KEINE		
WO 9200795	A	23-01-1992	DE EP 4021728 A 0539399 A		09-01-1992 05-05-1993
US 4385974	A	31-05-1983	KEINE		
US 3803020	A	09-04-1974	AT 330723 B AT 601972 A BE 787105 A CH 576140 A DE 2140417 A DK 128858 B FR 2148642 A GB 1368403 A IT 962641 B JP 48031992 A JP 52043598 B NL 7208660 A,B SE 386980 B		12-07-1976 15-10-1975 01-12-1972 31-05-1976 27-07-1972 15-07-1974 23-03-1973 25-09-1974 31-12-1973 26-04-1973 31-10-1977 14-02-1973 23-08-1976
EP 0171680	A	19-02-1986	DE 3430064 A JP 61057848 A		27-02-1986 24-03-1986
EP 0287513	A	19-10-1988	AT 83077 T CA 1335805 A DE 3876273 A DK 191388 A FI 881652 A,B, GR 3007124 T HK 192495 A IE 62803 B JP 2049305 C JP 7081987 B JP 63263457 A PT 87210 A,B US 4971670 A US 5082548 A		15-12-1992 06-06-1995 14-01-1993 12-10-1988 12-10-1988 30-07-1993 29-12-1995 08-03-1995 25-04-1996 06-09-1995 31-10-1988 12-05-1989 20-11-1990 21-01-1992
WO 9825136	A	11-06-1998	AU 5185198 A		29-06-1998
US 4874490	A	17-10-1989	DE 68918550 D DE 68918550 T EP 0366897 A JP 2151758 A JP 2701943 B		03-11-1994 02-02-1995 09-05-1990 11-06-1990 21-01-1998
US 4666581	A	19-05-1987	JP 60236057 A JP 1842625 C JP 5048421 B JP 61104248 A		22-11-1985 12-05-1994 21-07-1993 22-05-1986

THIS PAGE BLANK (USPTO)